



**Centro de Ingeniería
Genética y Biotecnología
División de Vacunas**

Efecto adyuvante de los antígenos de la superficie y la nucleocápsida del virus de la hepatitis B y su utilidad en el desarrollo de candidatos vacunales.

Tesis en opción al grado científico Doctor en Ciencias Biológicas

Autor: Lic. Julio César Aguilar Rubido

Tutores: Dr. Eduardo Pentón Arias
Dra Verena L. Muzio González

**Ciudad de La Habana
2007**



A Fabio

SINTESIS

El presente trabajo se enmarca en el campo de la vacunología, específicamente, en el desarrollo de nuevas estrategias de adyuvación para potenciar candidatos vacunales preventivos y terapéuticos contra la infección por el virus de la hepatitis B (VHB).

La obtención de los antígenos de la nucleocápsida y de la envoltura del VHB por vía recombinante así como el conocimiento de las características físico-químicas e inmunológicas de estos antígenos, sirvieron de base a los estudios sobre el efecto adyuvante de ambos antígenos cuando son inoculados en formulaciones combinadas. Estos estudios evaluaron la respuesta inducida por la administración mucosal y parenteral de dichas formulaciones.

En este trabajo se demostró que el antígeno de la nucleocápsida del VHB, obtenido como nucleoproteína particulada, es capaz de inducir en ratones una rápida y potente respuesta inmune sistémica y mucosal cuando se administra por vías mucosales, y es la inoculación intranasal la que generó la respuesta más intensa en ambos compartimentos del sistema inmune. Se demostró además, que la administración intranasal del HBsAg y el HBcAg en una formulación combinada potenció la respuesta inmune humoral y celular contra ambos antígenos. Esta respuesta se detectó en los compartimentos mucosal y sistémico y se caracterizó por su alta intensidad y larga duración.

La administración nasal a humanos de una formulación combinada de estos antígenos generó inmunidad contra el VHB en la mayoría de los voluntarios. Por otra parte, la administración simultánea mucosal/parenteral de las formulaciones combinadas a ratones transgénicos HBsAg (+), permitió subvertir el estado de tolerancia inmunológica contra este antígeno. Adicionalmente, fue posible verificar el efecto adyuvante del HBsAg cuando se administró por vía intranasal en formulaciones combinadas junto a otros antígenos de interés vacunal, lo que amplía el alcance del efecto inmunopotenciador de este antígeno más allá del marco de la inmunización contra el VHB y con antígenos de distinta naturaleza físico-química.

Este trabajo contribuye a la obtención y caracterización inmunológica de una alternativa novedosa de inmunización a partir del efecto adyuvante de los antígenos recombinantes del VHB. El tipo de respuesta generada demostró su utilidad en el modelo murino de infección crónica por el VHB y la evaluación clínica inicial demostró que es posible inducir una respuesta inmune contra el VHB por la vía nasal en humanos. Consideramos que el diseño de formulaciones vacunales que se basen en el efecto adyuvante de los antígenos recombinantes HBsAg y HBcAg puede constituir una nueva alternativa a considerar en el campo de la inmunización terapéutica.

1	INTRODUCCION	1
2	REVISION BIBLIOGRAFICA	6
2.1	Hepatitis viral tipo B. Antecedentes históricos.....	6
2.1.1	Características generales del virus de la hepatitis B.....	6
2.1.2	Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B	7
2.1.3	Antígeno de la nucleocápsida viral (HBcAg).....	9
2.2	La infección por el virus de la Hepatitis B	11
2.2.1	Epidemiología.....	11
2.2.2	Evolución de la infección.....	12
2.3	Prevención de la infección por el virus de la hepatitis B.....	15
2.3.1	Vacunación preventiva, estado actual.....	15
2.3.2	Empleo de adyuvantes en el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales contra el VHB	16
2.4	Tratamiento de la infección crónica por el VHB	18
2.4.1	Tratamientos actuales.....	18
2.4.2	Inmunoterapia	19
2.5	Inmunización mucosal con antígenos del VHB y empleo de adyuvantes mucosales.....	24
3	MATERIALES Y METODOS	26
3.1	Animales	26
3.2	Participantes del estudio clínico.....	26
3.3	Microorganismos empleados en la obtención de proteínas recombinantes	26
3.4	Línea celular empleada	26
3.5	Medio de cultivo empleado.....	26
3.6	Reactivos y soluciones empleados.....	27
3.7	Antígenos y adyuvantes empleados.....	27
3.8	Formulaciones empleadas en los estudios de inmunogenicidad.....	28
3.9	Péptidos y proteínas	29
3.10	Anticuerpos y conjugados empleados.....	30
3.11	Obtención de la nucleoproteína particulada HBcM492.....	31
3.12	Obtención del antígeno HBcRIV-2.....	32
3.13	Estudios de inmunogenicidad	33
3.13.1	Inmunizaciones	33
3.13.2	Extracciones de sangre y lavados mucosales.....	34
3.13.3	Evaluación de la inmunogenicidad de la nucleoproteína recombinante HBcM492 en ratones Balb/c.....	34
3.13.4	Estudio de la respuesta inmune inducida en ratones Balb/c por formulaciones combinadas del HBcAg y el HBsAg inoculadas por vía IN	35
3.13.5	Evaluación del efecto adyuvante del HBcAg sobre una variante del antígeno de superficie obtenido en células de mamíferos	38
3.13.6	Estudio de la respuesta inmune generada en ratones Balb/c por la administración de formulaciones combinadas del HBsAg y otros antígenos de interés vacunal	38
3.13.7	Evaluación de la respuesta inmune inducida en voluntarios saludables inmunizados con la formulación nasal combinada de HBsAg y HBcAg	40

3.13.8	Evaluación de la respuesta inmune inducida por la mezcla del HBsAg y del HBcAg por vía parenteral en diferentes formulaciones.....	42
3.13.9	Estudio de la inmunogenicidad de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg en ratones transgénicos HBsAg (+)	43
3.14	Métodos analíticos	44
3.14.1	Determinación de la concentración de proteínas	44
3.14.2	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	44
3.14.3	Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida y de agarosa	44
3.14.4	Tinción de geles de electroforesis de proteínas con Coomassie azul R-250	44
3.14.5	Inmunodetección mediante “Western blot”	45
3.14.6	Método para el estudio del reconocimiento de epítopes lineales.....	45
3.14.7	Microscopía electrónica de transmisión.....	46
3.14.8	Determinación de la homogeneidad molecular del HBcAg purificado por cromatografía líquida de alta resolución.....	47
3.14.9	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida	47
3.14.10	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la determinación de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos celulares.....	48
3.14.11	Ensayo de proliferación linfocitaria.....	49
3.14.12	Método para determinar la frecuencia de células secretoras de IFN- γ mediante ELISPOT	49
3.15	Análisis estadísticos	51
4	RESULTADOS.....	53
4.1	Evaluación de la capacidad del HBcAg (variante HBcM492) para formar partículas de naturaleza química nucleoproteica	53
4.2	Estudio de la inmunogenicidad del antígeno recombinante HBcM492.....	54
4.2.1	Evaluación de la inmunogenicidad del HBcAg (variante HBcM492) administrado por vía parenteral	54
4.2.2	Evaluación de la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 administrada por varias rutas mucosales	55
4.3	Estudio de la inmunogenicidad de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg inoculadas por la vía IN.....	57
4.3.1	Comparación de la inmunogenicidad del HBsAg en la formulación combinada, con formulaciones que contienen Acemanano (vía IN) o ALOOH (vía SC)	57
4.3.2	Comparación de la inmunogenicidad del HBsAg en la formulación combinada con formulaciones que contienen toxina del cólera (vía IN) o ALOOH (vía IP)	58
4.3.3	Inmunogenicidad por vía IN de dos variantes del HBcAg y estudio de la respuesta inmune de las formulaciones combinadas con el HBsAg.....	60
4.3.4	Estudio del patrón de reconocimiento de secuencias lineales del HBcAg de sueros y secreciones de ratones y de los sueros de humanos infectados.	62
4.3.5	Efecto de la dosis del HBcAg en la inmunogenicidad del HBsAg y duración de la respuesta inmune contra ambos antígenos por vía IN.....	65
4.4	Caracterización de la respuesta inmune inducida por la administración nasal de la formulación combinada de los antígenos del VHB	68

4.4.1	Estudio de la respuesta de subclases de IgG en suero	68
4.4.2	Evaluación de la respuesta celular inducida por la formulación combinada de los antígenos del VHB.	69
4.5	Estudio de la formulación combinada por técnicas de ME y cromatografía de exclusión molecular de alta resolución.	72
4.5.1	Estudio de la formulación combinada por ME de transmisión.....	72
4.5.2	Estudio del perfil cromatográfico de la formulación combinada mediante técnica de cromatografía de exclusión molecular de alta presión.....	73
4.6	Evaluación del efecto del HBcAg sobre la inmunogenicidad de una segunda variante del HBsAg por vía IN.	74
4.7	Estudio del efecto de la inoculación intranasal de formulaciones combinadas del HBsAg con antígenos heterólogos de interés vacunal	75
4.7.1	Evaluación del efecto del HBsAg sobre la inmunogenicidad del toxoide tetánico, el toxoide diftérico y <i>Bordetella pertussis</i> inactivada.....	75
4.7.2	Evaluación del efecto del HBsAg sobre la inmunogenicidad del antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis C (HCcAg).....	79
4.8	Inmunogenicidad por vía nasal de una formulación que contiene al HBsAg y al HBcAg en voluntarios saludables.....	81
4.9	Evaluación de la respuesta inmune inducida por formulaciones combinadas del HBsAg y del HBcAg por vía parenteral.	82
4.10	Respuesta inmune anti-HBsAg en ratones Balb/c y en ratones transgénicos inmunizados con las formulaciones combinadas administradas por vía IN y SC	84
5	DISCUSION	86
5.1	Obtención de la nucleoproteína HBcM492 como PSV y con alta pureza	86
5.2	Estudio de la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 administrada a ratones Balb/c por diferentes vías de inoculación.	87
5.3	Estudio de la inmunogenicidad de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg inoculadas por la vía IN.....	89
5.4	Estudio de la respuesta celular inducida por la administración nasal de la formulación combinada de los antígenos del VHB	92
5.5	Estudio del efecto de la inoculación IN de formulaciones combinadas del HBsAg con antígenos heterólogos de interés vacunal.....	93
5.6	Inmunogenicidad por vía nasal de una formulación que contiene al HBsAg y al HBcAg en voluntarios saludables.....	95
5.7	Evaluación de la respuesta inmune inducida por formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg por vía parenteral	97
5.8	Respuesta inmune anti-HBsAg en ratones transgénicos inmunizados con las formulaciones combinadas administradas simultáneamente por las vías IN y SC.....	98
5.9	Consideraciones generales	99
6	CONCLUSIONES	100
7	RECOMENDACIONES.....	101
8	ANEXOS	102
9	BIBLIOGRAFIA	104

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido (s)
AcM	Anticuerpo monoclonal
Acs	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALOOH	Abreviatura utilizada en la literatura para referirse a los adyuvantes basados en el hidróxido de aluminio
ALT	Alanina-amino transferasa
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	del inglés ' <i>bovine seroalbumin</i> ' (Albúmina sérica bovina)
Bp	<i>Bordetella pertussis</i> (bacteria inactivada, antígeno vacunal)
Co120	Variante génica que contiene la región codificante para los primeros 120 aa de la proteína de la cápsida del VHC
CPA	Células presentadoras de antígenos
Da	Daltons
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
DMF	Dimetilformamida
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
h	Horas
HBcAg	Proteína de la cápsida del VHB
HBsAg	Proteína de la envoltura del VHB
HCCAg	Proteína de la cápsida del VHC (la forma inmadura abarca 191 aa y la forma madura 173 aa)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta resolución)
ID	Intradérmica
IE	Índice de estimulación
IFN- γ	Interferón γ
IFN- α	Interferón alfa
IN	Intranasal
IP	Intraperitoneal
IR	Intrarrectal
ISCOMs	del inglés ' <i>Immune- Stimulating Complexes</i> ' (complejos inmuno-estimuladores)
IV	Intravaginal
kb	1000 pares de bases
kDa	1000 Daltons
Log MGT	Logaritmo de la media geométrica de los títulos
LPS	Lipopolisacárido
ME	Microscopía electrónica de transmisión
MG	Media geométrica
MGT	Media geométrica de los títulos
min	Minutos
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en geles de poliacrilamida)

OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PPM	Patrón de pesos moleculares
PSV	Partículas semejantes a virus
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SC	Subcutáneo(a)
SFB	Suero fetal bovino
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SL	Sublingual
TC	Toxina del cólera
TT	Toxoide tetánico
TD	Toxoide diftérico
Th1	Respuesta T auxiliadora tipo 1
Th2	Respuesta T auxiliadora tipo 2
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α
UOP	Unidades de opacidad
Tris	Tris (hidroximetil)-metilamina
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C

1 INTRODUCCION

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que más de un tercio de la población mundial ha sido infectada por el virus de la hepatitis B (VHB). Se estima que entre un 5 y un 10% de los adultos, y hasta un 90% de los recién nacidos, desarrollan la infección de forma persistente, con 350 millones de personas portadoras del virus a nivel mundial. La replicación sostenida del VHB durante un largo período de tiempo conduce a una enfermedad hepática progresiva, que evoluciona a cirrosis hepática y/o cáncer del hígado en aproximadamente el 25% de los portadores. Se plantea que anualmente se producen más de un millón de muertes relacionadas a la infección por este virus en sus distintas formas de evolución **(1)**.

El tratamiento con Interferón alfa (IFN- α), su variante conjugada al polietilenglicol (PEG) y los análogos de nucleósidos o nucleótidos como son la Lamivudina, el Adefovir-dipivoxil, el Entecavir y la Telbivudina, constituyen el estado del arte en el tratamiento de la hepatitis B crónica (HBC). De modo general, estos fármacos tienen una pobre eficacia en cuanto a eliminación sostenida del virus y su empleo se asocia a importantes efectos secundarios **(2)**.

El desarrollo de una vacuna con un alto porcentaje de efectividad para la prevención de la hepatitis B constituyó un importante logro de la medicina preventiva a nivel mundial. En la actualidad, más de 150 países ofrecen la vacuna anti-hepatitis B mediante programas de inmunización a niños, adolescentes y grupos de riesgo. La primera generación de vacunas se basó en el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) purificado e inactivado del plasma de portadores asintomáticos. Estas preparaciones fueron inmunogénicas, no obstante, se sustituyeron rápidamente por vacunas recombinantes producidas en levaduras **(1)**, las que brindan mayor seguridad.

En la actualidad se investiga en el desarrollo de formulaciones más inmunogénicas y eficaces, a partir de la introducción de potentes adyuvantes, lo que pudiera beneficiar a individuos no respondedores y a personas inmunodeprimidas. Por otra parte, estos desarrollos podrían reducir el número de administraciones o la dosis empleada en la vacuna actual **(1)**.

Desde la década del 90 del siglo pasado se realizan investigaciones para evaluar el uso de la vacunación como tratamiento de la infección crónica por el VHB. Esta estrategia

terapéutica cuenta con un marcado interés, a partir de los resultados que han puesto en evidencia el papel fundamental de la respuesta inmune en el control de dicho virus. Los grupos que trabajan en esta temática buscan subvertir del estado de inmunotolerancia contra el VHB, a partir de la administración de formulaciones vacunales (3).

Los resultados recientes en el campo de la inmunoterapia, utilizando las vacunas preventivas convencionales con fines terapéuticos, sugieren la necesidad de investigar el uso de candidatos vacunales más potentes, que incluyen nuevos antígenos, adyuvantes, nuevas rutas de administración y terapias combinadas racionales (4).

El diseño de candidatos vacunales óptimos debe tener en cuenta los aspectos relacionados con el componente antigénico, así como los que se relacionan con el componente adyuvante de la formulación. La importancia de la inmunidad celular contra el antígeno de la nucleocápsida del VHB (HBcAg) en el control de la infección crónica por el VHB se demostró mediante técnicas de transferencia adoptiva de inmunidad (3).

Tanto el HBcAg como el HBsAg poseen características atractivas para su inclusión en vacunas terapéuticas. Las características inmunológicas de estos antígenos recombinantes se deben en parte a su naturaleza físico-química. Ambos antígenos son partículas semejantes a virus (PSV), el HBsAg posee una naturaleza proteoliposomal y el HBcAg es de naturaleza nucleoproteica. Tomando en consideración el impacto de estas características sobre el sistema inmunológico y atendiendo a los requerimientos de la respuesta inmune protectora contra el VHB (1, 2, 3), se formuló la siguiente **hipótesis de trabajo**: “**Los antígenos recombinantes de la nucleocápsida y de la envoltura del VHB, son capaces de potenciar la respuesta inmune de antígenos coadministrados, lo que favorece su empleo en el desarrollo de nuevos candidatos vacunales**”.

Para investigar la validez de esta hipótesis nos propusimos los siguientes **objetivos y tareas**:

Objetivo 1: Estudiar la respuesta inmune generada por el HBcAg, sintetizado en *Escherichia coli*, cuando es administrado por diferentes rutas de inmunización.

Tareas:

1. Evaluación de la capacidad del HBcAg (variante HBcM492) para formar partículas de naturaleza química nucleoproteica.

2. Evaluación de la inmunogenicidad en términos de IgG sérica de la proteína HBcM492 en ratones Balb/c inoculados por ruta intraperitoneal (IP) con dosis decrecientes de este antígeno.
3. Evaluación de la respuesta inmune en términos de IgG sérica e IgA en pulmón y vagina, generada por la administración de la proteína HBcM492 por diferentes vías mucosales: intranasal (IN), intrarrectal (IR), oral, intravaginal (IVag), y sublingual (SL).
4. Estudio de la antigenicidad de la proteína HBcM492 con los sueros de ratones inmunizados con las variantes HBcM492 y HBcRIV-2, y con los sueros de pacientes con reactividad anti-HBcAg.

Objetivo 2: Estudiar la respuesta inmune generada por la administración de formulaciones combinadas del HBcAg y el HBsAg en el modelo murino y en humanos.

Tareas:

1. Caracterización de la respuesta inmune humoral inducida en ratones Balb/c por la administración IN de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg, en cuanto a su intensidad, duración y patrón de subclases de la respuesta de IgG en suero.
2. Evaluación de la capacidad linfoproliferativa y de secreción de IFN- γ de células de bazo de ratones inmunizados por vía IN con formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg.
3. Evaluación en ratones Balb/c del efecto adyuvante del HBcAg sobre una variante del antígeno de superficie de la hepatitis B obtenida en células de mamíferos.
4. Evaluación de la respuesta inmune inducida en voluntarios saludables inmunizados con la formulación nasal que contiene los antígenos HBsAg y HBcAg.
5. Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones Balb/c por la administración de formulaciones del HBsAg y el HBcAg, por vía parenteral.
6. Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones transgénicos HBsAg (+) inmunizados con formulaciones combinadas inoculadas por las vías IN y SC.

Objetivo 3: Estudiar la respuesta inmune generada en ratones Balb/c por la administración de formulaciones combinadas del HBsAg y otros antígenos de interés vacunal.

Tareas:

1. Evaluación de la respuesta inmune inducida por la administración nasal de formulaciones combinadas del HBsAg y los antígenos toxoide tetánico, toxoide diftérico y *Bordetella pertussis* (célula inactivada).
2. Evaluación de la respuesta inmune inducida por la administración nasal de formulaciones combinadas del HBsAg y el antígeno de la nucleocápsida del VHC, obtenido como una partícula nucleoproteica en *Escherichia coli*.

Este trabajo consta de los siguientes elementos científicos **novedosos** que se han publicado y patentado, informándose por primera vez a la comunidad científica.

- Constituye el primer estudio de la inmunogenicidad mucosal del HBcAg, a nivel internacional, en el que se evidencia la alta inmunogenicidad del HBcAg.
- Se evaluaron por primera vez, a nivel internacional, las formulaciones que combinan al antígeno de superficie del VHB y una variante particulada de la nucleoproteína HBcAg completa (183 aminoácidos), por rutas mucosal (IN) y parenteral (SC, IM, IP).
- Se demostró por primera vez, a nivel internacional, el efecto adyuvante del HBcAg sobre el HBsAg y *viceversa*, fenómeno que se verificó a nivel de respuesta humoral y celular.
- Se demostró por primera vez el efecto adyuvante del HBsAg por vía nasal sobre otros antígenos de interés vacunal.
- Se evidenció, mediante técnicas de microscopía electrónica, la presencia de agregados entre el HBsAg y el HBcAg, los cuales se forman espontáneamente en la formulación líquida.
- Se demostró por primera vez, a nivel internacional, la inducción de respuesta protectora anti-HBV en individuos vacunados por la vía nasal como resultado de la administración de una formulación que combina al HBsAg y al HBcAg.
- Se demostró por primera vez la capacidad de la formulación combinada del HBsAg y el HBcAg para subvertir la tolerancia en un modelo de ratón transgénico HBsAg (+).

La **importancia práctica** de este trabajo consiste en la utilización de los resultados obtenidos en el diseño de medicamentos preventivos y terapéuticos contra el VHB. De hecho, la inmunogenicidad por vía nasal -en animales y en humanos- de los antígenos del VHB y el desarrollo de la formulación combinada, abrió el primer capítulo en el desarrollo de una vacuna nasal anti-hepatitis B a nivel internacional. De igual forma, se

hace posible la utilización de los antígenos del VHB como potenciadores de la respuesta inmune contra antígenos de otros microorganismos. Esto puede ser de utilidad práctica en el desarrollo de candidatos vacunales contra enfermedades como el SIDA y la hepatitis C. La **importancia teórica** de este trabajo radica en que el efecto adyuvante descrito para estos antígenos permitirá el diseño y evaluación de estrategias de vacunación con combinaciones de antígenos en los que uno de los componentes antigénicos de la formulación puede poseer al mismo tiempo actividad adyuvante. Este hallazgo podría racionalizar estrategias de adyuvación costosas y que requieren de múltiples evaluaciones de seguridad. Esto sería posible debido a que el papel adyuvante en estas formulaciones podría ser asumido por un antígeno de interés vacunal con un reconocido perfil de seguridad, -como puede ser el HBsAg. Adicionalmente, el uso de la metodología de la inmunización intranasal desde el modelo murino hasta humanos constituye un **aporte metodológico** al estudio de candidatos vacunales en Cuba. Del mismo modo, el empleo de los antígenos recombinantes del VHB como adyuvantes constituye un aporte metodológico en esta temática.

La tesis consta de Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas, Anexos y Autobiografía. Los resultados de este trabajo forman parte de una publicación nacional y 8 publicaciones internacionales, dos de ellas son artículos de revisión sobre la temática de los adyuvantes, que incluyen estos resultados. Parte de este trabajo está incluido en cuatro patentes internacionales publicadas y concedidas en diferentes países. Los resultados también se incluyen en protocolos clínicos enviados al CECMED.

Entre los avales relacionados con el trabajo de investigación se encuentran cuatro logros del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y dos premios anuales de la Academia de Ciencias de Cuba. Parte de este trabajo ha sido presentado en conferencias nacionales e internacionales. Este trabajo recibió un reconocimiento como la mejor presentación en cartel del Evento Internacional del Hígado en Shanghai, en el año 2006 y ha sido referido en un artículo de revisión en la temática de la inmunoterapia del VHB en la revista *Journal of Viral Hepatitis*, en el año 2007. Esta investigación se desarrolló en el CIGB y ha sido presentada ante el Consejo Científico de esta institución.

2 REVISION BIBLIOGRAFICA

2.1 Hepatitis viral tipo B. Antecedentes históricos.

Desde 1940 se conoce que una parte importante de las hepatitis es de origen viral, sin embargo, fue en 1965 que se descubrió el “antígeno de Australia” por Blumberg y colaboradores (5). Este antígeno fue considerado un marcador de la infección por el VHB, lo que permitió distinguir 2 infecciones virales distintas desde el punto de vista clínico, epidemiológico e inmunológico (6). Posteriormente, a partir de la visualización de las partículas del virus de la hepatitis A (VHA), se desarrollaron los ensayos para el diagnóstico de ambos virus (7). A partir de estos descubrimientos se ha podido acumular una gran cantidad de información sobre el diagnóstico, prevención y tratamiento de estas y otras enfermedades virales hepáticas (8).

2.1.1 Características generales del virus de la hepatitis B.

El VHB es un miembro de la familia *Hepadnaviridae*, que incluye un grupo de virus caracterizado por su tropismo hepático y por estar compuestos por ácido desoxiribonucleico (ADN) como material genético. El genoma del VHB está constituido por ADN parcialmente bicatenario, de aproximadamente 3200 pares de bases. El mismo contiene la información genética de 7 proteínas virales comprendidas en 4 marcos abiertos de lectura sobrelapados. El gen S contiene la información de las 3 proteínas de la superficie o envoltura viral, estas son las proteínas S, M y L. La proteína S constituye el 90% del contenido proteico de la envoltura. Las proteínas M, L y S poseen el mismo sitio de terminación en el genoma y diferentes sitios de iniciación de la transcripción. Como consecuencia, las proteínas M y L comparten los 226 aminoácidos de la proteína S, y adicionalmente cuentan con extensiones de 55 y 174 aminoácidos, respectivamente (9).

Por otra parte, se denominan gen C y gen P a los genes que contienen la información de las proteínas de la nucleocápsida y de la polimerasa viral, respectivamente. El gen X codifica para dos proteínas que actúan como potenciadores y activadores de la transcripción del genoma viral (9).

El VHB tiene forma esférica, 42 nm de diámetro, y está compuesto de una nucleocápsida proteica o antígeno de la nucleocápsida (HBcAg), que se encuentra cubierta por una envoltura lipoproteica. En el interior del HBcAg se encuentran el genoma viral, la polimerasa, y la proteína X (9).

2.1.2 Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B

2.1.2.1 Propiedades físico-químicas

Las proteínas de la envoltura del VHB son sintetizadas en exceso por los hepatocitos infectados, y son secretadas como proteínas independientes en forma de partículas subvirales. Estas partículas son pequeñas esferas de 22 nm de diámetro, aunque también se encuentran formando estructuras tubulares de distintos tamaños. Las partículas subvirales no poseen ácidos nucleicos y por tanto no son infecciosas. Adicionalmente, en forma pura son altamente inmunogénicas e inducen una eficiente respuesta antiviral de anticuerpos neutralizantes (9).

Las partículas de 22 nm están compuestas exclusivamente de la proteína de superficie y de lípidos derivados del hospedero, los que constituyen hasta un 30% del peso de la partícula. Esta partícula se conoce como antígeno de superficie del VHB (HBsAg). Los principales lípidos presentes en la partícula son los fosfolípidos, el colesterol, ésteres del colesterol y triglicéridos. Se ha sugerido que la partícula del HBsAg se organiza como una bicapa lipídica discontinua en interacción con agregados proteicos (10).

El HBsAg se produce actualmente en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* y *Pichia pastoris* y también en células de mamíferos. Estos antígenos recombinantes forman parte de vacunas preventivas establecidas en el mercado y que han demostrado alta eficacia preventiva (11).

En contraste con el antígeno producido en plasma y en células de mamíferos, las partículas producidas en levadura contienen solamente al antígeno S no glicosilado. A pesar de esto, las partículas derivadas de levadura se asemejan estructural y antigénicamente a las partículas derivadas de plasma y a las producidas en células de mamíferos (12).

Una diferencia importante entre el HBsAg natural y el obtenido en *Saccharomyces cerevisiae* consiste en su contenido lipídico y específicamente en la presencia de fosfatidil inositol. Este lípido no está presente en la partícula nativa. Adicionalmente, se ha podido comprobar que los fosfolípidos del antígeno producido en *Saccharomyces* contienen ácidos grasos más cortos e insaturados que los presentes en la partícula nativa y como resultado de esto, el antígeno recombinante presenta una mayor fluidez en su membrana lipídica (12).

El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología obtuvo como proteína recombinante al HBsAg utilizando como hospedero la levadura *Pichia pastoris*. Este antígeno forma parte de la vacuna cubana anti-Hepatitis B desde inicios de la década del 90 (13).

En estudios realizados utilizando técnicas cromatográficas se comprobó que un porcentaje pequeño, pero significativo, del HBsAg obtenido en *Pichia pastoris* en el CIGB es capaz de formar agregados supramoleculares de partículas, los cuales fueron purificados y caracterizados por su menor tiempo de retención (14).

2.1.2.2 Propiedades inmunológicas

El HBsAg tiene la capacidad de inducir una fuerte respuesta inmune específica de anticuerpos y de células T auxiliaadoras en personas sanas. Adicionalmente, se ha demostrado que existen epítopes del HBsAg que pueden ser presentados por moléculas de HLA clase I, aún cuando esta proteína es procesada por las células presentadoras de antígenos (CPA) como una proteína exógena. Esta propiedad permite al HBsAg no adyuvado inducir una respuesta citotóxica (CTL) específica para epítopes generados por vías alternativas de procesamiento, posibilitando la expansión del repertorio de células citotóxicas específicas para el HBsAg (Revisado en 15).

Una propiedad distintiva del antígeno de superficie producido en *Saccharomyces cerevisiae* es su capacidad de unión a monocitos de sangre periférica (16). El antígeno purificado de plasma no posee esta propiedad. Esta unión es mediada por el receptor CD14, -involucrado en la interacción de los lipopolisacáridos (LPS) con los monocitos-, y por una proteína soluble que es capaz de potenciar la unión del HBsAg recombinante a éstas células (17).

La unión a CD14 evidenciada por el HBsAg recombinante producido en *Saccharomyces cerevisiae* está relacionada a la capacidad de este antígeno para suprimir la inducción de citoquinas proinflamatorias estimuladas por el LPS y la interleuquina 2 (IL-2) *in vitro*. Se ha podido comprobar que la interacción con el HBsAg recombinante induce una regulación positiva de la expresión de la interleuquina 10, de reconocida actividad anti-inflamatoria, por parte de los monocitos humanos (16). Este tipo de regulación podría resultar adversa para el uso de este antígeno en la terapéutica antiviral.

Otros resultados relacionados muestran una nueva propiedad anti-inflamatoria del HBsAg recombinante producido en *Saccharomyces*: su capacidad de inhibición de COX-2, IL-18

e IL-12, lo que sugiere que el VHB puede regular la producción de IFN- γ inhibiendo la producción de IL-18 e IL-12. **(18)**.

La variación de la composición lipídica influye en las propiedades inmunológicas del HBsAg. Un estudio reciente demostró que la delipidación parcial del HBsAg incrementa la antigenicidad de las células T en experimentos con líneas de células T como con células mononucleares de sangre periférica sin fraccionar. En todos los experimentos se evidenció entre 10 y 100 veces mayor antigenicidad del HBsAg parcialmente delipidado. La evaluación *in vivo* de las partículas delipidadas evidenció una reducción en la antigenicidad de células B, sin embargo, la mezcla del antígeno delipidado con antígeno no delipidado indujo una respuesta igual o ligeramente superior a la inducida por el antígeno no tratado **(19)**.

2.1.3 Antígeno de la nucleocápsida viral (HBcAg)

2.1.3.1 Propiedades físico-químicas

El gen que codifica para la proteína de la nucleocápsida del VHB contiene dos codones de iniciación en fase. La transcripción a partir del segundo codón resulta en la expresión del HBcAg, proteína de 183 aa con una talla de 22 Kda, la cual interviene en la formación de la cápsida o núcleo del VHB. La transcripción a partir del primer codón produce una proteína de 25 Kda, la cual además de los 183 aa del HBcAg presenta 29 aa adicionales en la región amino-terminal. Esta región, de naturaleza hidrofóbica, funciona como un péptido señal que guía a la proteína precore al retículo endoplasmático donde es procesada, sufriendo rupturas proteolíticas en los aa -10 y 149, dando como resultado una proteína de 159 aa y 17 Kda de talla, la que es secretada a la sangre. El producto secretado es lo que se conoce como antígeno de secreción del VHB o HBeAg **(20)**.

No obstante a que el HBcAg y el HBeAg poseen una secuencia primaria idéntica desde el aminoácido 1 hasta el 149 –aproximadamente un 80% de homología de secuencia-, ambos antígenos tienen propiedades físicas y antigénicas marcadamente diferentes. De hecho el HBeAg no es un verdadero constituyente del VHB sino una variante secretada soluble de la proteína de la cápsida **(20)**.

El gen del HBcAg fue clonado y propagado por primera vez en *Escherichia coli* a finales de los años 70. La nucleocápsida del VHB ha sido obtenida por vía recombinante con una morfología similar al antígeno aislado de hepatocitos humanos infectados. El ensamblaje

intracelular de esta proteína da lugar a partículas de aproximadamente 30 nm, con una agrupación dimérica de geometría icosaédrica. La agrupación de los dímeros produce protuberancias en la superficie de la partícula y se ha sugerido que el espacio entre las protuberancias es óptimo para el entrecruzamiento de receptores inmunoglobulínicos de la membrana de las células B **(21)**.

Otra característica notable de la secuencia aminoacídica del HBcAg es la presencia, en el extremo carboxilo terminal, de una región rica en arginina. Esta región tiene la función de unir el ARN pregenómico en la partícula natural. En el caso de la partícula recombinante esta región se asocia a ARN bacteriano con tallas en un rango de 30 a 3000 nucleótidos, confiriéndole importantes propiedades inmunológicas **(22)**.

2.1.3.2 Propiedades inmunológicas

Desde mediados de 1980 se pudo comprobar que el HBcAg tiene propiedades inmunológicas únicas. Este antígeno ha resultado altamente inmunogénico en todas las especies inoculadas, produciendo respuesta de anticuerpos con una dosis de tan sólo 6 ng de antígeno en ausencia de adyuvantes. El HBcAg estimula preferencialmente células Th1 con una potencia 100 veces superior al HBsAg **(20)**.

La alta inmunogenicidad del HBcAg y su capacidad para inducir respuesta Th1 ha sido explicada por tres elementos fundamentales: a) la presencia en su secuencia primaria de múltiples epítopes de células T auxiliaoras capaces de inducir una potente respuesta inmune; b) su estructura particulada rígida que proporciona un espaciado adecuado entre las protuberancias de su superficie y el entrecruzamiento de receptores inmunoglobulínicos en la membrana de la célula B y c) la presencia de ARN encapsidado con capacidad adyuvante **(20)**.

Se ha descrito que el entrecruzamiento de receptores a nivel de células B por parte del HBcAg induce la secreción de IgM e IgG anti-HBcAg y la regulación positiva de moléculas coestimuladoras **(21)**. Se ha demostrado además la inducción de respuestas CTL a partir de la actividad presentadoras de células B activadas con el HBcAg **(23)**.

No obstante a la alta inmunogenicidad del HBcAg en modelos animales sanos, las células T CD8⁺ de pacientes con altos niveles de replicación viral son eliminadas o anergizadas y aun en condiciones de baja carga viral son difíciles de expandir **(15)**.

El HBcAg posee características inmunológicas muy diferentes a las del HBeAg no obstante a la gran homología de secuencia de ambos antígenos. Una serie de observaciones clínicas sugieren que el HBeAg juega un papel importante en la cronicidad del VHB (24, 25). Por ejemplo, se ha comprobado que la infección neonatal con un virus mutante HBeAg-negativo incrementa la probabilidad de infección aguda fulminante (26). Se pudo comprobar en ratones transgénicos que el HBeAg sérico actúa como un eficiente tolerógeno de células T anti-HBcAg. Estos resultados explican la correlación entre la aparición de mutantes HBeAg-negativos y el daño hepático severo (24-31).

El HBcAg también ha sido utilizado en múltiples estudios inmunológicos como proteína portadora. Un gran número de epítopes de interés vacunal han sido insertados en la secuencia de esta proteína por técnicas de ingeniería genética y otros antígenos han sido acoplados al HBcAg mediante conjugación química. En la actualidad se desarrollan estudios de inmunogenicidad utilizando la nucleocápsida del HBcAg y de otros hepadnavirus relacionados, como es el caso del antígeno de la nucleocápsida de marmotas (32-34).

2.2 La infección por el virus de la Hepatitis B

2.2.1 Epidemiología

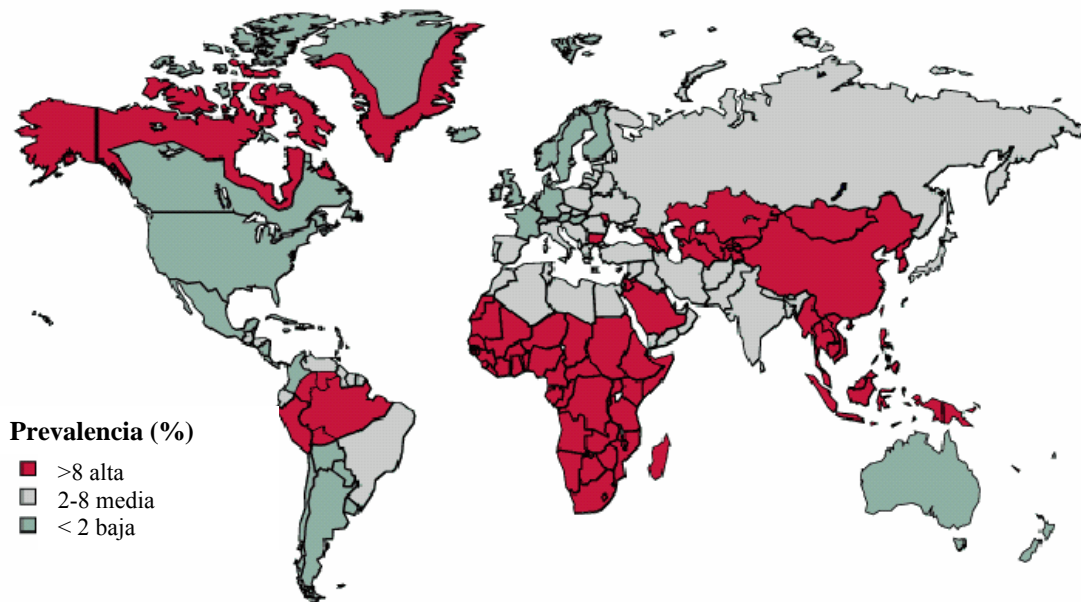
La hepatitis viral tipo B constituye un serio problema de salud a nivel mundial debido al alto número de portadores crónicos del virus, más de 350 millones de personas, y a su frecuente evolución a formas graves de enfermedad del hígado como son la cirrosis hepática y el carcinoma hepatocelular (1).

El VHB se transmite de modo desigual entre los diferentes países del mundo. En los países que realizan campañas de vacunación en niños recién nacidos y controles de calidad específicos a las donaciones de sangre, prevalece la vía de transmisión sexual, mientras que en aquellos países de alta prevalencia que aun no han adoptado la vacunación al nacer, la vía de transmisión perinatal es más importante (35). La transmisión del VHB ocurre por transfusiones de sangre contaminada, sin embargo, también puede ocurrir por inoculación accidental de cantidades mínimas de sangre o fluidos corporales contaminados con sangre de personas infectadas, este es el caso de las agujas y jeringuillas mal esterilizadas, la práctica de tatuajes y acupuntura con materiales no estériles, las perforaciones corporales con instrumental reutilizable, el intercambio de

cuchillas de afeitar, cepillos de dientes, toallas y otros objetos contaminados. Es importante destacar que hasta un 30% de los individuos infectados desconocen la causa o ruta de transmisión (1).

La HBC es responsable de más del 90% del total de casos de carcinoma hepatocelular en el mundo, uno de los 10 cánceres más comunes a nivel global (1). En los países desarrollados la HBC tiene una prevalencia entre el 0.2 y el 2%, sin embargo, constituye una de las primeras causas de cáncer del hígado. Por otra parte, en Asia, Africa y el Medio Oriente, la prevalencia de la Hepatitis B oscila entre el 5 y el 20%, siendo esta una de las principales causas de muerte. La figura 1 muestra la prevalencia de esta enfermedad a nivel mundial de acuerdo a las estadísticas actuales (35, 36).

Figura 1. Distribución global de la infección crónica por el VHB.



2.2.2 Evolución de la infección

El Virus de la Hepatitis B puede causar hepatitis aguda autolimitada, formas fulminantes de la infección, enfermedad crónica del hígado o puede adicionalmente producir un estado de portador asintomático. La madurez del sistema inmune en el momento de la infección juega un papel determinante en el desarrollo de una infección persistente (37, 38). Este aspecto se ilustra por el hecho de que más del 90% de los adultos eliminan al

VHB durante la infección aguda, mientras esta proporción se reduce a un 75% en niños de edades cercanas a los 5 años y a sólo el 10% de los neonatos **(36)**.

Entre el 15 y el 20% de los pacientes con HBC evolucionan a formas severas de la enfermedad como la cirrosis **(39)**. Estos pacientes también tienen un alto riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (CHC), particularmente luego del desarrollo de la cirrosis **(40)**.

Los portadores del VHB con mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular son los hombres mayores de 45 años, las personas con cirrosis y aquellos con historia familiar de CHC **(40, 41)**. Sin embargo, con menor frecuencia se puede desarrollar el CHC en personas sin cirrosis e incluso en portadores inactivos **(41)**.

La progresión hacia la cirrosis entre los pacientes con HBC es más frecuente en casos de coinfección con otros virus (HCV, HIV, HDV), abuso de alcohol, episodios recurrentes de exacerbación de las transaminasas, altos niveles de fibrosis o actividad necroinflamatoria severa en el momento del diagnóstico **(42)**.

En esta revisión nos vamos a concentrar en las formas aguda autolimitada y la forma crónica de la infección por el virus de la hepatitis B.

2.2.2.1 Hepatitis B aguda autolimitada

La Hepatitis B aguda es una enfermedad que puede transcurrir de manera asintomática o puede asociarse a ligeros síntomas no específicos, como el rash, la fatiga, el malestar, las náuseas, la fiebre y el dolor abdominal **(43)**. La misma se caracteriza por la eliminación del virus y con el desarrollo de una larga inmunidad, caracterizada por la presencia de anticuerpos contra el HBsAg, aunque algunos pacientes que se recuperan nunca desarrollan anticuerpos contra el HBsAg o los producen subsecuentemente. Estos pacientes generalmente no requieren de intervención médica **(43)**.

Los eventos inmunológicos que conllevan a una infección aguda autolimitada sugieren una contención inicial de la replicación viral y la maduración de una respuesta inmune adaptativa. Ambos fenómenos están asociados a la producción temprana de IFN- γ y TNF- α producidos por células NK y NK-T en el hígado **(44, 45)**. En el modelo de ratones transgénicos se ha podido demostrar que la activación de las células NK-T inhibe la replicación del VHB a través de la producción de IFN- γ **(46-48)**. Del mismo modo, los chimpancés infectados que desarrollan la infección aguda logran controlar rápidamente la

infección a partir de la secreción de IFN- γ por las células NK o células NK-T residentes (44). Esta primera etapa de activación de células NK y NK-T se continúa con una rápida respuesta inmune adaptativa responsable de la lisis hepática y el control viral subsiguiente (49-51).

2.2.2.2 Hepatitis B crónica

La definición de HBC de la Organización Mundial de la Salud se basa en la detección del HBsAg en suero en 2 ocasiones con un intervalo de 6 meses o más. Los niveles de enzimas hepáticas en suero pueden estar persistente o intermitentemente alterados por un período de 6 meses o mayor (52).

Para la HBC se describen en la actualidad 4 fases en base al comportamiento de la actividad inmunológica durante el desarrollo de la infección: la fase de inmunotolerancia, la fase de inmunoeliminación (también conocida por fase inmunoactiva), la fase inactiva y la fase de reactivación de la enfermedad (53).

La primera fase o fase de inmunotolerancia se caracteriza por altos niveles de replicación viral y también presencia del HBeAg en sangre, pero sin evidencias de enfermedad activa en el hígado, ausencia de síntomas, niveles normales de transaminasas en sangre y cambios mínimos en la histología hepática. Esta fase puede durar entre 10 y 30 años y en este tiempo la eliminación del HBeAg ocurre con muy baja frecuencia (53).

La fase de inmunotolerancia se continúa con una fase inmunoactiva o de inmunoeliminación viral, caracterizada por una mayor actividad de la respuesta inmune al VHB. En esta fase existen altos niveles de carga viral y un incremento en los niveles de transaminasas en la sangre así como necroinflamación moderada o severa del hígado (54). En aquellos pacientes en los que se produjo una transmisión perinatal de la enfermedad, la transición de la inmunotolerancia a la inmunoeliminación viral ocurre entre la segunda y cuarta décadas de vida. En aquellos pacientes infectados durante la adultez la fase de inmunotolerancia ocurre en muy raras ocasiones o ésta es de corta duración (54-55).

La fase inmunoactiva se continúa con una fase de inactividad como resultado del control que establece el sistema inmune sobre la infección crónica. La seroconversión espontánea de estado HBeAg (+) a anti-HBeAg (+) marca el inicio de la fase inactiva. Esto ocurre entre un 50 y un 70% de los pacientes en un período de 5 a 10 años (55). La transición a

la inactividad se caracteriza por una normalización de las transaminasas y la reducción de la carga viral por debajo de 10^4 - 10^5 copias de ADN viral por mL de suero **(53-55)**.

Aproximadamente 2 de cada 3 pacientes permanecerán en la fase de portadores inactivos luego de la seroconversión del HBeAg –algunos de ellos finalmente eliminarán el HBsAg. Estos últimos se dice que “resolvieron” la infección, aunque el ADN viral aun persiste en sus cuerpos y puede ser detectado por ensayos sensibles. **(56)**.

Una cuarta fase por orden temporal es la fase de reactivación. Los pacientes en esta fase son negativos al HBeAg, son anti-HBeAg positivos y tienen niveles de transaminasas elevados. La mayoría de estos pacientes poseen mutantes en la región anterior al gen de la nucleocápsida o región “precore” y/o en la región del promotor de dicho gen. Dichas mutaciones eliminan o regulan negativamente los niveles del HBeAg en la sangre. Estas variantes se han reportado en todas las partes del mundo, pero son más frecuentes en el Mediterraneo, el Medio Oriente y el Sudeste de Asia **(57)**.

La amplia mayoría de los pacientes en la fase de reactivación fueron HBeAg-positivos y tuvieron el VHB salvaje. La aparición de los mutantes ocurrió con antelación o asociado a la seroconversión al HBeAg. Un estudio reportó que aproximadamente el 25% de los pacientes que desarrollaron seroconversión al HBeAg progresaron a HBeAg negativa luego de una media de 8 años de seguimiento **(58)**.

2.3 Prevención de la infección por el virus de la hepatitis B

2.3.1 Vacunación preventiva, estado actual

El antígeno de superficie purificado de plasma demostró su capacidad de inducir una fuerte respuesta de anticuerpos y de células T auxiliaadoras en personas sanas y esta cualidad permanece en el HBsAg recombinante **(8)**. Es por ello que con posterioridad a la obtención de la vacuna con el HBsAg derivado de plasma, se desarrollaron diferentes vacunas basadas en el HBsAg recombinante. **(8)**.

En la actualidad, el HBsAg se encuentra formando parte también de nuevas formulaciones combinadas, que han permitido la inmunización al mismo tiempo contra múltiples enfermedades **(59)**.

Recientemente, una nueva vacuna monovalente ha sido aprobada por las autoridades regulatorias de los Estados Unidos. Esta nueva vacuna (Fendrix), consistente en una formulación del HBsAg y el lipido A monofosforilado (MPL) en hidróxido de aluminio

(ALOOH). Fendrix ha recibido la autorización para su uso en pacientes en hemodiálisis. En contraste con Engerix B, Fendrix induce una respuesta inmune más rápida, potente y duradera **(60)**.

2.3.2 Empleo de adyuvantes en el desarrollo de nuevas formulaciones vacunales contra el VHB

Los adyuvantes son moléculas o estrategias vacunales que promueven, potencian o modulan la respuesta inmune a los antígenos vacunales **(61)**. Los nuevos desarrollos en el campo de la vacunación preventiva anti-hepatitis B están dirigidos a optimizar las formulaciones actuales. Una estrategia ha sido el uso de nuevos adyuvantes o la adición de los adyuvantes al ALOOH dado que este no ha sido un adyuvante óptimo para vacunas basadas en el HBsAg –como es el caso de Fendrix **(60)**.

Una serie de investigaciones se han dirigido a obtener una vacuna que se administre en una o dos inoculaciones. De este modo se puede reducir el costo asociado a la vacunación, incrementando el porcentaje de individuos que completan el esquema de inmunización.

Con este objetivo se han desarrollado estudios clínicos en los que se evalúa la inmunogenicidad de formulaciones del HBsAg con nuevos adyuvantes. Un estudio clínico reciente desarrollado en 285 adultos demostró la mayor inmunogenicidad de una formulación basada en el HBsAg y el adyuvante RC-529, un monosacárido mimético del MPL. El resultado indicó que un régimen de dos administraciones de la vacuna adyuvada con RC-529, espaciadas en 30 días, fue suficiente para desarrollar seroprotección en el 99% de los individuos vacunados. La vacuna comercial sólo indujo un 84% de seroprotección **(62)**.

Una formulación del HBsAg en la que se coadministró un oligonucleótido inmunoestimulante fue evaluada en la clínica. Este estudio tuvo como controles la vacuna Engerix-B y un grupo placebo. Este candidato resultó bien tolerado y se encontró que el 79% de los individuos inmunizados con el mismo generaron títulos protectores luego de una sola administración. En comparación, sólo el 12% de los vacunados con Engerix-B generaron títulos protectores luego de la primera dosis. **(63)**. Se corrobora de este modo resultados en chimpancés en el que se demostró el incremento en la rapidez y la potencia de la respuesta humoral en el grupo inmunizado con el antígeno adyuvado con la mezcla

del antígeno y oligonucleótidos que contienen secuencias CpG, sugiriendo su potencial uso en la reducción del número de dosis **(64)**.

Otra estrategia seguida en la reducción del número de dosis es el uso de microesferas de ácido poli-láctico y co-glicólico (PLGA) para la liberación controlada del HBsAg. El estudio en el modelo murino de diferentes proporciones de los componentes de estas microesferas permitió optimizar la respuesta inmune contra el HBsAg, haciendo atractiva esta tecnología para el diseño de una vacuna de una sola administración **(65)**.

Los nuevos candidatos vacunales de uso preventivo han sido evaluados en individuos no respondedores a la vacunación convencional así como en personas con diferentes inmunodeficiencias, con el objetivo de conocer si pudieran constituir alternativas vacunales en estos grupos poblacionales. El desarrollo de candidatos más potentes podría beneficiar a los pacientes infectados con HIV, los pacientes que usan fármacos inmunosupresores, los pacientes tratados con quimioterapias, los pacientes con cáncer, los pacientes en hemodiálisis y las personas de edad avanzada.

Los pacientes infectados con el VIH constituyen, desafortunadamente, un grupo de personas cuyo número se encuentra en ascenso a nivel mundial. Se ha demostrado que estos pacientes no responden adecuadamente a la vacunación, al punto que en los pacientes con SIDA en los que el conteo de células T CD4⁺ se haya por debajo de 50 células/mm³, la vacunación convencional es muy poco efectiva. **(66)**. El adyuvante CpG 7909 ha sido utilizado en pacientes infectados con VIH y bajo tratamiento antiviral. Este adyuvante se ensayó combinado con la vacuna Engerix-B. Al grupo control se le administró Engerix-B. La vacunación con el nuevo adyuvante generó un incremento en el nivel de seroprotección con respecto al nivel obtenido por el grupo control. La respuesta en el grupo inmunizado con el nuevo adyuvante alcanzó el 100% de seroprotección a los 10 meses de culminada la vacunación, mientras que la vacuna Engerix-B indujo un 63% de seroprotección en igual período de tiempo **(67)**.

Un estudio realizado en ratones de edad avanzada, utilizado como modelo animal de la inmunodepresión natural, mostró que la adición de los oligodesoxinucleótidos que contienen secuencias ricas en CpG (ODN-CpG) a una preparación vacunal del HBsAg indujo un incremento en los niveles de respuesta de IgG (IgG1 e IgG2a) anti-HBsAg y la estimulación de la respuesta de IFN- γ e IL-12 de células de bazo en cultivo **(68)**.

Como resultado de los avances en la nanotecnología, nuevos adyuvantes particulados han sido ensayados con el HBsAg, como son las nanopartículas basadas en hidroxipatita (69) y las vesículas de surfactantes catiónicos y derivados de micobacterias (70, 71).

Como se puede apreciar, existe un desarrollo impetuoso en el campo de la prevención, dado fundamentalmente por la inclusión de potentes adyuvantes, ya sea usándolos como aditivos o como sustitutos de los adyuvantes basados en aluminio.

2.4 Tratamiento de la infección crónica por el VHB

El objetivo del tratamiento de la HBC es lograr la supresión o control de la replicación viral de modo que permita un nivel de daño hepático mínimo o la reversión del mismo. Se reporta que existe una probabilidad mínima de desarrollo de carcinoma hepatocelular y de cirrosis hepática en aquellos pacientes con una carga viral sostenida por debajo de 10^4 copias de ADN del VHB por mL de suero (72,73).

2.4.1 Tratamientos actuales

En la actualidad se encuentran aprobados por las agencias regulatorias un total de 6 productos para el tratamiento de la HBC. Estos productos se dividen en 2 categorías: los que se basan en el IFN- α y los análogos de nucleósidos o nucleótidos (Tabla 1).

El IFN- α ha sido utilizado para el tratamiento de la HBC por más de 15 años. Recientemente fue aprobado el uso del interferón conjugado al polietilenglicol (interferón pegilado), que posee características superiores en cuanto a tiempo de vida media en sangre y efectividad terapéutica. El IFN- α tiene algunas limitaciones, entre ellas sus efectos adversos; su menor eficacia en pacientes con alta carga viral y el incremento en los niveles de ALT en un porcentaje de los pacientes tratados -lo que conlleva a complicaciones en aquéllos con bajos niveles de transaminasas y a que no se recomiende en cirróticos (74). El interferón pegilado tiene un mayor tiempo de vida media en sangre y se administra una vez por semana, confiriendo mayor eficacia y un mejor perfil de seguridad (75,76).

Con respecto a los antivirales, la Lamivudina fue el primer inhibidor de la polimerasa viral aprobado para uso en el tratamiento de la HBC. Posteriormente han sido aprobados el Adefovir Dipivoxil, el Entecavir y muy recientemente la Telbivudina. De modo general los antivirales producen una fuerte reducción de la carga viral, asociada a un elevado porcentaje de normalización de las transaminasas así como a mejoría en los

parámetros histológicos. El problema fundamental de los antivirales consiste en la relativa facilidad con que se desarrollan los mutantes de escape y la necesidad de un tratamiento prolongado durante varios años dado el alto índice de recaída viral. El porcentaje de pacientes que desarrollan mutantes es de un 30 y un 70% para el Adefovir y la Lamivudina, respectivamente, a los 5 años de iniciado el tratamiento (77, 78).

El Entecavir, que ha mostrado una mayor capacidad para reducir la carga viral, produce muy pocos mutantes, sin embargo la efectividad de este antiviral se reduce en pacientes con mutantes a la Lamivudina, en los que se incrementa la aparición de mutantes al Entecavir (79, 80).

Los tratamientos con antivirales evolucionan en la actualidad a estrategias terapéuticas combinadas, que constituyen alternativas exclusivas de países desarrollados y cuyo objetivo primario es suprimir al máximo la carga viral reduciendo la posibilidad de aparición de mutantes de escape y recaídas virales (81).

Tabla 1. Productos aprobados para el tratamiento de la HBC, precio aproximado por tratamiento en el año 2006 en EUA (82).

Nombre	Fecha de Aprobación (Precio/tto. EUA, 2006)
Interferon alfa-2b	1991 (7 600 USD / 24 sem)
Lamivudina	1998 (2 240 / 52 sem)
Adefovir dipivoxil	2002 (6038 / 48 sem)
Peginterferon alfa-2a	2005 (16 170 USD / 48 sem)
Entecavir	2005 (7 203 / 48 sem)
Telbivudina	2006 (No hay datos)

2.4.2 Inmunoterapia

El concepto de inmunoterapia en el tratamiento de la HBC implica la reactivación de una respuesta inmune deficiente con el objetivo de controlar la replicación viral y eliminar o controlar la infección. Este concepto ha sido validado directamente en estudios de trasplante de médula ósea. Se pudo demostrar que el trasplante de médula ósea de donantes con inmunidad al VHB a pacientes receptores infectados crónicamente por este virus fue capaz de curar la infección crónica de los pacientes receptores (83,84).

Durante la infección crónica por el VHB la respuesta de células efectoras T y B es pobre, inexistente o con deficiencias funcionales en las células efectoras y presentadoras profesionales, sin embargo los pacientes que desarrollan la infección aguda autolimitada muestran una respuesta citotóxica y auxiliadora fuerte, policlonal y multiespecífica contra las proteínas de la envoltura, la nucleocápsida y la polimerasa (85). Por otra parte, durante la infección crónica los niveles de secreción de citoquinas asociadas a la respuesta Th1 por linfocitos de sangre periférica estimulados con los diferentes antígenos virales es muy pobre, al contrario de lo que sucede durante la infección aguda (86,87). Estos hallazgos sugieren que la potenciación de la respuesta inmune específica puede constituir una alternativa terapéutica.

Otro hallazgo de interés es el hecho de que los pacientes que se recuperan espontáneamente de la HBC, o aquéllos que responden al tratamiento con IFN- α , son capaces de desarrollar respuestas citotóxicas de similar intensidad a la encontrada en pacientes que desarrollan la infección aguda (88). Adicionalmente, se demostró un incremento en los niveles de respuesta celular CD4+ y CD8+ en pacientes tratados con Lamivudina, sugiriendo que es posible inducir una respuesta inmune a partir de la supresión sostenida del virus (89,90).

Dentro de las estrategias inmunoterapéuticas, la vacunación terapéutica constituye una alternativa explorada desde mediados de la década de 1990 en el tratamiento pacientes infectados crónicamente por el VHB. Las principales estrategias inmunoterapéuticas han tomado como centro a los antígenos de la envoltura y de la nucleocápsida viral.

2.4.2.1 Uso de vacunas preventivas y formulaciones que emplean diferentes adyuvantes en la inmunoterapia contra la enfermedad crónica por el VHB

Una serie de estudios controlados han permitido evaluar la seguridad y la eficacia preliminar de algunas vacunas preventivas en el tratamiento de la HBC. La vacuna GenHevac B (Aventis Pasteur, Francia), pionera en su evaluación clínica, evidenció su capacidad de producir una respuesta inmune importante en algunos casos de pacientes HBeAg (+) que seroconvirtieron, lo cual se asoció a una reducción de la carga viral, aunque de modo estadísticamente no significativo en ambos casos (91).

En un segundo estudio realizado en 43 niños crónicamente infectados con el VHB, en el que se suministraron tres dosis de 20 μ g de GenHevac B con una frecuencia mensual no

se encontró efecto de la vacunación en la replicación viral o en la seroconversión al HBeAg. Los niños de este estudio se infectaron al nacer y su carga viral estaba en niveles muy altos, como sucede en este tipo de pacientes en la fase de inmunotolerancia **(92)**.

Un tercer estudio, basado en el mismo protocolo de vacunación pero esta vez tratando a 31 pacientes portadores asintomáticos del VHB (con carga viral indetectable) produjo la eliminación del HBsAg y la producción de anticuerpos contra este antígeno en 3 pacientes **(93)**. Estos resultados sugieren que la vacuna es capaz de estimular la respuesta inmune preferentemente en pacientes con baja carga viral **(93)**.

La vacuna Engerix B ha sido evaluada en combinación con la Lamivudina. En una primera evaluación el grupo de estudio incluyó 14 pacientes, quienes fueron tratados con vacuna inoculada por vía IM y Lamivudina oral, mientras 11 pacientes se incluyeron en el grupo control y fueron tratados sólo con el antiviral. Al finalizar el estudio un total de 9 pacientes evidenciaron eliminación viral en el grupo de estudio, mientras que sólo 5 lo hicieron en el grupo control **(94)**. A partir de estos resultados, comenzó un estudio clínico Fase III con Engerix B administrada a pacientes sometidos a supresión previa de la carga viral con el uso de Lamivudina, el que actualmente está en curso **(95)**.

Una vacuna anti-hepatitis B japonesa (Tokyo Mitsubishi, Japón) fue evaluada en combinación con el tratamiento antiviral de Lamivudina en 15 pacientes **(96)**. Como grupo control, 57 pacientes recibieron Lamivudina solamente. Los pacientes recibieron 12 dosis de 20 microgramos de la vacuna por vía intradérmica con una frecuencia bi-semanal a partir del tercer mes de tratamiento con Lamivudina, de modo que utilizaron el momento en que la carga viral está siendo controlada. El tratamiento combinado así como el tratamiento con Lamivudina continuaron hasta terminados los 12 meses.

Como resultado de este estudio se evidenció la seronegativización del 100% de la carga viral en el 100% de los pacientes HBeAg(+) tratados con la combinación terapéutica, contra un 48% de los pacientes tratados con el antiviral. Asociado a este resultado, se demostró un incremento en la seroconversión del HBeAg(+) a anti-HBeAg en pacientes HBeAg(+) (56% vs. 16%). Ambos resultados, obtenidos al final del tratamiento de un año con Lamivudina, fueron significativos. En adición, en el grupo de la combinación, a diferencia del grupo control, no existieron pacientes que tuvieran recaídas virológica o

bioquímica, lo que evidenció la seguridad de este tratamiento para la indicación específica **(96)**.

Los pacientes que seroconvirtieron a anti-HBeAg fueron aquellos que tuvieron una carga viral inicial inferior. Este estudio demostró la importancia del control de la carga viral para obtener respuestas clínicamente significativas.

La inmunoterapia activa también ha sido utilizada en pacientes portadores del VHB sometidos a trasplante hepático con el objetivo de favorecer el desarrollo de una respuesta inmune que evite la reinfección. El tratamiento actual para evitar la reinfección de estos pacientes resulta muy costoso por la necesidad de utilizar grandes cantidades de inmunoglobulinas anti-Hepatitis B.

Un estudio reciente evaluó el efecto de la administración mucosal del HBsAg en pacientes con HBC. En este estudio se administró a los pacientes el HBsAg por vía oral tres veces por semana durante 6 meses. Durante el tratamiento la carga viral disminuyó de modo importante en 36% de los pacientes, asociándose a la seroconversión a anti-HBeAg en el 26% de los pacientes. La mayoría de ellos mostraron mejoría en el hígado **(97)**.

Una nueva formulación del HBsAg en el adyuvante AS04 -basada en una mezcla de saponina, MPL y un adyuvante oleoso-, fue administrada a un total de 10 pacientes sometidos a trasplantes hepáticos e infectados por el VHB. Esta formulación fue capaz de inducir una respuesta inmune protectora en 4 de 10 pacientes, dos de ellos con trasplante producto de hepatitis fulminante. En estos 4 pacientes se produjo inmunidad a la reinfección durante 18 meses, en los que no se administró terapia con inmunoglobulinas **(98)**. En un estudio más reciente se evaluó una formulación del adyuvante MPL y el HBsAg en pacientes que eran VHB(-) y HBsAg(+) previo al trasplante. El estudio comenzó al detenerse la terapia con inmunoglobulinas y la vacuna se administró durante dos ciclos de 3 inmunizaciones. Solo 1 de 8 pacientes generó niveles de anticuerpos protectores contra el HBsAg **(99)**. En otro estudio del mismo grupo se utilizó la vacunación convencional usando un esquema de administración repetida de la vacuna en cuatro ciclos de 3 inmunizaciones cada uno. Como resultado, sólo se produjo respuesta inmune de anticuerpos anti-HBsAg en 2 pacientes de un total de 24 **(100)**.

De modo general los resultados de la inmunoterapia utilizando el HBsAg son pobres, sin embargo, dejan abierta una ventana al desarrollo de formulaciones más potentes y estrategias de adyuvación más elaboradas.

2.4.2.2 HBcAg e inmunoterapia

La importancia de la inmunidad celular contra el HBcAg en el control de la infección crónica de la hepatitis B se demostró mediante técnicas de transferencia adoptiva de inmunidad. Los estudios realizados en pacientes con HBC sometidos a transferencia adoptiva de células de médula ósea de donantes inmunes evidenciaron que es posible la eliminación del HBsAg del suero de estos pacientes. El estudio de los pacientes que lograron eliminar el HBsAg con este tratamiento permitió evidenciar que la resolución de la infección crónica por el VHB se relacionó a la transferencia de linfocitos T CD4+ específicos para el HBcAg. Los resultados de los estudios de transferencia adoptiva sugieren por tanto que la inmunización terapéutica de los pacientes con HBC debe incluir a la proteína de la nucleocápsida con el objetivo de inducir respuestas celulares específicas contra este antígeno (101).

Un candidato vacunal lipopeptídico que incluye al epítipo HBc (18-27), y a un epítipo de células T auxiliaadoras del toxoide tetánico acoplados a dos moléculas de ácido palmítico ha sido evaluado en pacientes con HBC. Este preparado resultó seguro e inmunogénico cuando se administró a personas sanas, sin embargo cuando se administró a pacientes con HBC indujo respuestas muy inferiores y no modificó los niveles de transaminasas o la serología específica (4).

2.4.2.3 Estrategias de adyuvación empleadas en la vacunación terapéutica.

En la actualidad se trabaja en el desarrollo de varias estrategias de adyuvación de antígenos para su uso en la inmunoterapia de la HBC. Entre estas entre ellas la administración de vacunas de ADN (102-104). Un estudio clínico fase I evaluó la respuesta inmune de 12 pacientes con HBC a los que se le administraron 12 inyecciones de 5 plásmidos diferentes. Los plásmidos, que incluían las secuencias de las proteínas de la envoltura, de la nucleocápsida y de la polimerasa se administraron de conjunto con un plásmido que codificaba para la IL-12, simultáneamente con un tratamiento con Lamivudina. Un total de 6 pacientes fueron identificados como respondedores en este estudio dada su capacidad de eliminar al virus durante 1 año posterior al tratamiento

(102). La diferencia en el nivel y persistencia de las respuestas de células T entre este estudio y otro realizado con vacunas de ADN que sólo incluía la secuencia de la envoltura (103) pudo estar relacionada con la composición de la vacuna -que incluye múltiples antígenos-, pero también podría deberse al uso de la IL-12 como adyuvante genético, con el estado clínico de los pacientes al enrolarse en el estudio -bajos niveles de carga viral-, o con el uso simultáneo de antivirales.

Otras estrategias de inmunopotenciación aplicadas al desarrollo de vacunas terapéuticas contra la HBC se basan en el uso de células dendríticas pulsadas con antígenos (105) o infectadas con virus atenuados (106), así como el empleo de las formulaciones basadas en potentes adyuvantes como las saponinas y el MPL descritas anteriormente, las que cuentan con la capacidad de desarrollar fuertes respuestas de tipo humoral y celular, imprescindibles para el control de la infección crónica (107).

Algunos autores sugieren el empleo de la combinación de diferentes candidatos vacunales basados en proteínas, vacunas de ADN y virus atenuados como estrategia de inmunopotenciación de la respuesta al VHB. Incluso se ha ensayado exitosamente la sustitución de la vacuna Engerix por el antígeno de superficie sin adyuvante en estrategias complejas de inmunización con varios candidatos vacunales en modelos animales (108).

La eficacia obtenida por las vacunas terapéuticas ensayadas en los estudios realizados hasta el presente se considera modesta, y se sugiere que el futuro de la vacunación de pacientes con HBC se basará en candidatos más potentes así como en la combinación de diferentes terapias (4).

2.5 Inmunización mucosal con antígenos del VHB y empleo de adyuvantes mucosales

Los estudios de inmunización a través de las rutas mucosales utilizando antígenos del VHB se han incrementado a partir del desarrollo de los adyuvantes mucosales. Este tipo de inmunizaciones han sido desarrolladas tanto con objetivos preventivos como terapéuticos.

Un antecedente de este trabajo fue la administración nasal en ratones Balb/C del HBsAg formulado en el polisacárido acemanano. Esta formulación indujo una respuesta inmune potente en compartimentos sistémicos y mucosales, similar en intensidad a la respuesta

que se obtuvo por vía nasal utilizando la toxina del cólera (TC) como adyuvante y comparable con la inmunogenicidad inducida por vía parenteral por la vacuna anti-hepatitis B producida en el CIGB denominada Heberbiovac HB **(109)**.

En la actualidad se estudian múltiples estrategias de inmunización mucosal que utilizan el HBsAg y diversos adyuvantes o sistemas de envío de antígenos. La ruta más frecuentemente utilizada es la ruta nasal. La inmunización intranasal del HBsAg utilizando como adyuvante ODN CpG es una de las estrategias de adyuvación mucosal mejor estudiadas en el modelo murino. Los ODN CpG han demostrado su capacidad de inducir una potente respuesta inmune sistémica y mucosal contra el HBsAg. Del mismo modo se ha verificado su actividad inmunomoduladora Th1 sobre la respuesta inmune y la capacidad de modular en este sentido respuestas Th2 establecidas a partir de la inmunización con la alúmina **(110-112)**.

Otro adyuvante utilizado previamente por vía parenteral con el HBsAg, el MPL, también ha demostrado su efecto potenciador y modulador por la ruta nasal y su capacidad de potenciar la respuesta anti-HBsAg a nivel mucosal **(113)**.

La inserción del HBsAg en micropartículas lipídicas **(114)** o poliméricas **(115)** con el objetivo de promover la capacidad de adhesión a la mucosa nasal ha demostrado tener efecto adyuvante sobre el HBsAg administrado por vía nasal, potenciando la respuesta inmune en suero y a nivel de mucosas **(115)**.

En estos momentos existe un proyecto a nivel internacional para obtener una vacuna nasal anti-hepatitis B. El mismo se basa en la utilización de nanopartículas como adyuvante nasal del HBsAg. Este proyecto, auspiciado por la fundación de Bill y Melinda Gates, pretende obtener una vacuna nasal preventiva anti-Hepatitis B en 5 años **(116)**.

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Animales

Se utilizaron ratones Balb/c hembras, haplotipo H-2^d, de 8 a 12 semanas de edad en todos los estudios de inmunogenicidad en animales, excepto en un estudio en el que se utilizó la línea C57/B16, haplotipo H-2^b. Los animales fueron adquiridos en el Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Cuba).

Se utilizaron además ratones transgénicos que expresan el HBsAg en el suero de forma estable. Estos ratones fueron obtenidos en el CIGB mediante técnicas de transgénesis (117).

3.2 Participantes del estudio clínico

Un total de 19 voluntarios saludables con edades comprendidas entre los 18 y los 45 años, sexo masculino y ausencia de marcadores serológicos del VHB, el VIH o el VHC, se seleccionaron para su participación en un estudio clínico Fase I de una formulación de los antígenos del VHB.

3.3 Microorganismos empleados en la obtención de proteínas recombinantes

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* W3110 (ATCC # 27325: genotipo thyA36 deoc2, IN(rrnD-rrnE)1 rph pyrE Lambda^{-F⁻}) (118), transformada con el plásmido pHBcM-492 k-Core, este microorganismo expresa la proteína HBcM492. La misma cepa W3110 fue utilizada en la obtención de las proteínas HBcRIV-2 y HCCAg120, a partir de su transformación con las construcciones pRIV-2 y pSLCo120, respectivamente.

Las cepas 139 y 509 de la bacteria inactivada *Bordetella pertussis* (Instituto Pedro Rangel, Venezuela) fueron utilizadas como antígenos en estudios de inmunogenicidad.

3.4 Línea celular empleada

La línea de célula tumoral p815, que se corresponde con una línea de mastocitoma murino de haplotipo H2-d se utilizó como célula blanco en el ensayo para la determinación de la frecuencia de células secretoras de IFN- γ mediante la técnica de ELISPOT.

3.5 Medio de cultivo empleado

En la obtención del HBcAg (variante HBcM492) se utilizó medio LB (*Luria-Bertani*), cuya composición por litro se corresponde con 10 g de triptona, 5 g de extracto de

levadura y 10 g de cloruro de sodio. Este medio se preparó de acuerdo a lo establecido por Sambrook y colaboradores (118).

3.6 Reactivos y soluciones empleados

Los **reactivos** empleados se obtuvieron de las firmas Oxoid (Inglaterra), Merck (Alemania) y Sigma (EUA) y el isótopo radiactivo timidina tritiada se obtuvo de Amersham-Pharmacia-Biotech (Inglaterra).

Entre las **soluciones** empleadas se encuentran aquellas utilizadas en procedimientos de ensayos inmunoenzimáticos en fase sólida (ELISA) y ELISPOT. Como son:

Solución tampón fosfato salino (PBS): NaCl 0,1 mol/l, KCl 2 mmol/l, Na₂HPO₄ 10 mmol/l, KH₂PO₄ 1mmol/l (pH=7,2)

Solución tampón de recubrimiento: Na₂CO₃ 11mmol/l, NaHCO₃ 35 mmol/l (pH=9,6)

Solución de lavado: Tween 20 (BDH, Inglaterra) al 0,05% volumen -volumen (v-v) en PBS

Solución de bloqueo: leche descremada (Oxoid LTD, Inglaterra) al 2% masa –volumen (m-v) en PBS.

Solución de dilución de las muestras: leche descremada al 1% m-v, tween 20 al 1% v-v en PBS

Solución tampón sustrato: Na₂HPO₄ 52mmol/l y ácido cítrico 25mmol/l (pH=5,6).

Solución del sustrato de la peroxidasa: *o*-fenilendiamina 1mg/ml (Sigma, EUA) y H₂O₂ al 3 % v-v en solución tampón sustrato.

Solución del sustrato de la fosfatasa alcalina: dietanolamina (Sigma, EUA) al 9,7 % m-v, MgCl₂ 0,01 % m-v (pH=9,8).

Las soluciones empleadas en la purificación del HBcAg, así como en los métodos analíticos se describen en los acápites correspondientes.

3.7 Antígenos y adyuvantes empleados

El HBsAg recombinante subtipo adw2, producido en *Pichia pastoris* (CIGB, Cuba), con más de un 95% de pureza, se utilizó en todos los esquemas de inmunización. En algunos experimentos se empleó, además, el HBsAg recombinante, subtipo adw2, producido en células CHO de mamíferos, al que denominamos HBsAg-BB (Berna Biotech, Suiza), que incluye las regiones Pre-S1 y Pre-S2 de la envoltura viral (119).

El HBcAg en su variante HBcM492 (CIGB, Cuba), fue expresado como proteína recombinante de 183 aa, purificada de *Escherichia coli* (cepa W3110). La variante HBcRIV-2 (CIGB, Cuba), expresada en la misma cepa a partir de su transformación con la construcción pRIV-2, también se utilizó en estudios de inmunogenicidad, su pureza fue superior al 90%. La diferencia entre la variante HBcM492 y la variante HBcRIV-2 consiste en la presencia de 8 aa adicionales en el extremo carboxilo-terminal correspondientes a la secuencia: KLGSVDLN, para un total de 191 aa en HBcRIV-2. Ver la Figura 11 para mayores detalles de la secuencia aminoacídica de ambas proteínas.

El antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis C (VHC), variante trucada de 120 aa denominada HCcAg120, se expresó en *Escherichia coli* (cepa W3110) y se purificó con más de un 90% de pureza, según se ha reportado previamente (**120**).

Los antígenos toxoide tetánico (TT), lote TT117 y toxoide diftérico (TD), lote DT105, así como las cepas 134 y 509 de *Bordetella pertusis*, inactivadas para su uso como bacterinas (Instituto Rangel, Venezuela), se utilizaron en distintas formulaciones combinadas con el HBsAg.

Todos los antígenos utilizados en estos estudios fueron donados por sus productores a excepción del antígeno HBcM492.

Por vías parenterales se utilizaron como adyuvantes el ALOOH (Superfos Biosector, Dinamarca), y las Algamulinas (ANU, Australia), que son formulaciones de adyuvantes compuestas por ALOOH y γ -inulina co-cristalizados en diferentes proporciones. Por la ruta IN se utilizó al manósido acetilado Acemanano (CIGB, Cuba) y a la TC (Sigma, EUA) empleados como adyuvantes en grupos control inoculados por esta vía.

3.8 Formulaciones empleadas en los estudios de inmunogenicidad

Los antígenos de la superficie y de la nucleocápsida del VHB se ensayaron por vía IN en ratones, coadministrados en formulaciones que se diferenciaron en la proporción de estos antígenos en la mezcla, empleándose las razones 1:1; 1:2 y 1:4, respectivamente. El HBsAg se utilizó a una concentración de 0,1 mg/mL y el HBcAg a 0,1, 0,2 y 0,4 mg/mL de concentración final. La composición por mL de la formulación nasal combinada aparece en la Tabla 2. Esta se corresponde con la mezcla de los antígenos HBsAg y HBcAg (variante HBcM492) disueltos en PBS en una proporción 1:1.

Tanto la formulación nasal combinada como el resto de las formulaciones empleadas se inocularon a pH 6,8-7,2 y se conservaron a 4°C hasta su uso. En los estudios de inmunogenicidad realizados con antígenos homólogos o heterólogos, la composición de la formulación nasal descrita en la Tabla 2 sólo varió por la sustitución o adición de los nuevos antígenos, los que se emplearon en alguna de las proporciones descritas anteriormente.

Los antígenos HBcRIV-2, HBsAg-BB, TT, TD y la bacterina Bp, también se disolvieron en PBS y se mezclaron con los antígenos de la superficie o de la cápsida del VHB, atendiendo a las características del esquema de inmunización.

Por vía parenteral se emplearon las formulaciones monovalentes del HBsAg adsorbido al ALOOH o a los adyuvantes compuestos de ALOOH y γ -inulina. También se empleó la formulación monovalente Heberbiovac HB, que contiene al HBsAg, y la tetravalente Trivac-HB (CIGB, Cuba), que contienen al HBsAg y los antígenos TT, TD, Bp. En ambas formulaciones los antígenos están adsorbidos al ALOOH (0,5 mg/mL).

Tabla 2. Composición por mililitro de la formulación nasal que contiene a los antígenos de la nucleocápsida y de la superficie del VHB empleados en una proporción 1:1.

Ingredientes	Cantidad por 1 mL
HBsAg	0,1 mg
HBcAg (HBcM492)	0,1 mg
EDTA	1,74 mg
NaCl	4,2 mg
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	1,25 mg
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	1,4 mg
Agua para inyección	hasta 1 mL

La dosis de cada uno de los antígenos empleados en formulaciones por vía nasal o parenteral se describe en los estudios de inmunogenicidad descritos en el acápite 3.13.

3.9 Péptidos y proteínas

Se emplearon un total de 31 **péptidos sintéticos**, de 12 aa cada uno, sobrelapados en 6 aa y conjugados a membrana de celulosa. Estos péptidos abarcaron la secuencia íntegra de la proteína HBcAg, variante HBcRIV-2.

El péptido utilizado en el estudio de la respuesta celular anti-HBsAg S₍₂₈₋₃₉₎ cuya secuencia es IPQSLDSWWTSL, se sintetizó en el Departamento de Síntesis de Péptidos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), de acuerdo al método de síntesis en fase sólida (**121**) en la resina de 4-metilbenzhidrilamina 1 mmol/g (Fluka, Suiza), usando la estrategia del terc-butiloxicarbonilo/Benzilo. El conjunto resina-péptido se separó con fluoruro de hidrógeno usando el procedimiento "Bajo-Alto" en presencia de los reactivos adecuados y se lavó 3 veces con éter. Los péptidos se extrajeron con ácido acético al 30%, se purificaron en cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución (Vydac C18, 10x250 mm) y se solubilizaron en PBS a una concentración de 2 mg/mL. Las siguientes **proteínas** se utilizaron como patrones de peso molecular en la electroforesis en geles de poliacrilamida: Aprotinina (6,5 kDa), Lisosima (14 kDa), β -lactoglobulina (18 kDa), Inhibidor de tripsina (21 kDa), Quimotripsinógeno (25 kDa), Anhidrasa carbónica (31 kDa), Albumina de huevo (43 kDa), Albumina de suero bovino (67 kDa), Fosforilasa b (97 kDa), β -galactosidasa (116 kDa), Miosina (200 kDa).

3.10 Anticuerpos y conjugados empleados

Los anticuerpos y conjugados empleados se obtuvieron de las firmas Becton Dickinson (EUA), Sigma (EUA) y Amersham-Pharmacia-Biotech (Inglaterra). Los conjugados se emplearon en diluciones de trabajo que oscilaron en un rango de 1:1000 a 1: 10 000, en dependencia del análisis previo de la dilución óptima de trabajo.

Los conjugados utilizados en las evaluaciones de ELISA y ELISPOT se encuentran los conjugados a peroxidasa o biotina de los anticuerpos anti-inmunoglobulinas de ratón (IgG e IgA) y contra las subclases de IgG de ratón (IgG1, IgG2a e IgG2b).

Adicionalmente, en la evaluación de los niveles de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo o en la determinación de la frecuencia de células secretoras de IFN- γ por la técnica de ELISPOT, se utilizó el par de anticuerpos monoclonales específicos para el IFN- γ : el anticuerpo de captura y el anticuerpo biotinilado. Ambos reconocen a esta molécula por determinantes diferentes y son comercializados por la firma Becton-Dickinson (EUA) para su empleo en la técnica de ELISA/ELISPOT.

3.11 Obtención de la nucleoproteína particulada HBcM492

La proteína HBcM492 se purificó a partir de la cepa W3110 transformada con el plasmidio de expresión correspondiente a la construcción genética pHbCm492 (122). La proteína codificada por dicho plasmidio se denominó HBcM492.

El proceso de fermentación y purificación de esta proteína se realizó de conjunto con otro compañero del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, en cuya tesis se reflejarán los detalles del proceso. En síntesis, la cepa transformada se inoculó a dos tubos de precultivo con 5 mL de medio LB con Kanamicina (LBKW) y se incubó durante 12 h a 37 °C en agitador orbital (Retomed, Cuba). Posteriormente se inoculó 1 mL del precultivo en 500 mL de medio LBKW y se incubó el cultivo durante 6 h a 37 °C y 200 g. Una vez crecido el cultivo hasta la fase logarítmica se inoculó el fermentador de 5 L (Marubishi, Japón) en medio LBKW a 200 rpm. El cultivo comenzó con una DO de 0,4 a 530 nm y fue crecido durante 6 h. Posteriormente se realizó la inoculación en un fermentador de 50 L modelo MSJ-U₃ (Marubishi, Japón) de medio M9 y se incubó durante 16 horas a 100 rpm. Culminado este tiempo se centrifugó el cultivo para recuperar la biomasa, la cual se lavó con un homogenizador Ultraturrax[®] (IKA, Japón) a una concentración de 1 g de biomasa húmeda por cada mL de solución tampón fosfato, pH 6,0. Se centrifugó la biomasa por 15 minutos a 10 000 rpm y 4°C. El precipitado se fraccionó en porciones de 130 g, las que se guardaron a -20 °C hasta el siguiente paso.

El precipitado celular se resuspendió en 30 mL de buffer TE y se realizó la ruptura celular mediante tres pases del material resuspendido por un homogeneizador de alta presión (Avestín, Canadá). Posteriormente, la preparación se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min a la temperatura de 4°C para eliminar el debris celular. El sobrenadante obtenido se almacenó a 4°C hasta el siguiente paso.

Se realizó una precipitación diferencial con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄) al 15% y al 35% de saturación. El precipitado se resuspendió en tampón de equilibrio de la cromatografía de intercambio iónico (50 mM Na₂HPO₄; 6 mM EDTA; 250 mM NaCl; pH 6,0), la homogenización se realizó con el homogenizador mecánico tipo Politrón y se centrifugó el resuspendido por 15 min, 4°C a 12 000 rpm.

El material se aplicó a una columna de Fractogel TMAE 650 S (Merck, EUA). La columna se equilibró con una solución tampón compuesta por Na_2HPO_4 50 mM; EDTA 6 mM; NaCl 250 mM; pH 6,0. De esta manera el HBcAg se fijó a la matriz. Posteriormente, se realizaron dos lavados consecutivos, el primero con la solución tampón con que se equilibró la columna y el segundo con solución de fosfato de sodio 50 mM; 6 mM EDTA; 400 mM NaCl; pH 6,0. A continuación, se procedió a la elución con una solución tampón que contiene una fuerza iónica mayor (fosfato de sodio 50mM; EDTA 6 mM; NaCl 700 mM; pH 6,0). El flujo de trabajo fué de 100 cm/h. Al finalizar, el eluato de intercambio iónico se concentró por ultrafiltración hasta un volumen final de 90 mL, a la temperatura de 4°C, en un concentrador Amicon 8200 con una membrana plana cuyo límite de exclusión fué de 300 000 Da .

El concentrado del paso anterior se aplicó a una columna de 5,0 cm x 80 cm, empacada con matriz Sepharosa CL-4B (Pharmacia, Suecia) y equilibrada con una solución tampón que contiene Tris 0,1 M, NaCl 0,15 M y ditiotreitól (DTT) 2 mM a pH 7,5. La corrida se realizó a un flujo de elución de 0,2 mL/min, controlado por una bomba peristáltica P1 (Pharmacia, Suecia). Para coleccionar las fracciones se usó un coleccionador Redifrac (Pharmacia, Suecia), y se coleccionaron fracciones de 2 mL. Al terminar la corrida se chequearon por electroforesis en SDS-PAGE las fracciones correspondientes a los máximos de los picos obtenidos y así se seleccionó aquella en que eluyó el HBcAg. Las fracciones que conforman fueron mezcladas, dializadas contra PBS, concentradas 10 veces en un concentrador Amicon 8200, y almacenadas a -20°C.

3.12 Obtención del antígeno HBcRIV-2

La construcción pRIV-2HBc para la expresión del HBcAg en *Escherichia coli* (cepa W3110), así como el proceso para su cultivo y purificación fué establecido previamente en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (123). Esta proteína se obtuvo originalmente para su uso en sistemas de diagnóstico. En síntesis, el cultivo se realizó en medio LB suplementado con 50 µg/mL de ampicilina y 20 µg/mL de kanamicina en un volumen de 30 mL durante 12 h a 28 °C hasta una DO de 1,0. La inducción de la expresión se realizó sometiendo al cultivo a 42°C de temperatura, por espacio de 4h, en agitación. Luego se centrifugó el cultivo a 10 000 g por 10 min, las células se

resuspendieron en TE y se realizaron tres pases del material por el homogeneizador de alta presión.

El sobrenadante de la ruptura se sometió a precipitación diferencial con sulfato de amonio al 10% y al 40% de saturación. El precipitado del 40% de saturación se resuspendió en tampón Tris 0,1M, NaCl 0,15M, DTT 2mM y 0,01% de azida sódica, pH 7,5. Este material concentrado se aplicó a una columna cromatográfica de filtración en gel, utilizando una matriz Sepharosa CL-4B y una columna de dimensiones 1,6 cm x 80 cm, equilibrada con el mismo tampón. Las fracciones correspondientes a la proteína se colectaron, mezclaron, concentraron y almacenaron a -20°C. Con este proceso se obtuvieron niveles de pureza superiores al 90%.

3.13 Estudios de inmunogenicidad

Se realizó la evaluación de la inmunogenicidad de formulaciones monovalentes y combinadas en las que se coadministraron los antígenos del VHB con otros antígenos de interés vacunal por diferentes rutas de inoculación. Todos los estudios en animales se realizaron en ratones Balb/c hembras de 8 a 12 semanas de edad, excepto en un estudio en el que se utilizaron ratones C57/B16.

3.13.1 Inmunizaciones

Las formulaciones administradas parenteralmente se inocularon por las vías IP, IM y SC, todas estas administraciones se realizaron en un volumen de 0.1 mL y sin necesidad de anestesia. La administración IP se realizó situando al ratón en posición decúbito supino e inclinándolo para situar al ratón con la cabeza por debajo del nivel de las patas traseras, e inyectando la formulación luego de que el intestino se acomodara al moverse en dirección hacia el tórax. Las inyecciones IM y SC se realizaron en la zona de la espalda, controlando convenientemente el nivel de penetración de la aguja o insertando la aguja debajo de la piel, respectivamente.

Las inoculaciones mucosales se realizaron con una micropipeta P200 (Gibson, EUA) en un volumen de 0,05 mL. Sólo se procedió a anestesiarse a los ratones en el caso de las formulaciones inoculadas por vías IN, oral y SL, y esto se hizo inyectando por vía IP un volumen de 0,03 mL de ketamina a 10 mg/mL. En el caso de las rutas oral, IVag, IR y SL este volumen de ketamina se depositó en la mucosa. En el caso de la administración nasal, los ratones fueron anestesiados y la administración de las formulaciones se llevó a

cabo situando al ratón en posición decúbito supino y dejando caer cantidades de aproximadamente 5 μL con espacios de tiempo entre gota y gota, permitiendo la localización de la inoculación a la mucosa nasofaríngea.

3.13.2 Extracciones de sangre y lavados mucosales

La sangre se extrajo mediante punción en el plexo retrorbital para un volumen máximo de hasta 0,1 mL por ratón y se depositó en tubos Eppendorf[®]. Se realizó incubación de la sangre a 4°C durante al menos 1 h y luego fue centrifugada a 6 000 g por 10 minutos en una centrífuga de tubos Eppendorf[®] (Eppendorf, Alemania), desechando el precipitado celular y trasladando el sobrenadante a tubos limpios. El suero se conservó a -20°C hasta su evaluación.

El lavado de la mucosa vaginal se realizó utilizando una micropipeta P200, lavando varias veces el interior de la vagina con el reflujo en tres ocasiones de 0,1 mL de PBS estéril. Se tomó el contenido del lavado y se centrifugó a 6000 g durante 10 minutos en centrífuga Eppendorf para eliminar partículas y mucus insoluble. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta su evaluación.

El homogenato de la mucosa pulmonar se realizó luego de sacrificados los ratones, extrayendo y homogenizando los pulmones, previamente lavados, en 1 mL de PBS estéril. Posteriormente, se separó el debrís mediante centrifugación a 6000 rpm por 10 minutos en una centrífuga Eppendorf. El sobrenadante se guardó a -20°C hasta su evaluación.

3.13.3 Evaluación de la inmunogenicidad de la nucleoproteína recombinante HBcM492 en ratones Balb/c

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína HBcAg (variante HBcM492), 6 grupos de 8 ratones fueron inoculados por vía intraperitoneal (IP) con dosis decrecientes de HBcAg. Las administraciones se realizaron los días 0 y 15, los sueros se colectaron los días 10 y 25. La respuesta de IgG específica anti-HBcAg se evaluó por ELISA. Las variantes ensayadas se describen a continuación (Esquema A):

- I. Grupo 1: 5 μg de HBcAg en PBS.
- II. Grupo 2: 1 μg de HBcAg en PBS.
- III. Grupo 3: 0,2 μg de HBcAg en PBS.
- IV. Grupo 4: 0,04 μg de HBcAg en PBS.

V. Grupo 5: 0,008 µg de HBcAg en PBS.

VI. Grupo 6: PBS

Con el objetivo de evaluar la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 cuando ésta es administrada por diferentes rutas mucosales, se utilizaron 8 grupos de 8 ratones, los que fueron inoculados por las vías: IP, intranasal (IN), oral, intravaginal (IVag), sublingual (SL), intrarrectal (IR) y subcutánea (SC). Tres grupos fueron usados como controles del experimento, un grupo placebo y dos grupos inmunizados por las rutas intraperitoneal (IP) y subcutánea (SC), respectivamente. El esquema de inmunización tuvo 3 administraciones, los días 0, 15, 30, y una dosis de refuerzo el día 180, evaluándose la cinética de la respuesta de anticuerpos y el efecto de la dosis de refuerzo por las diferentes rutas. Diez días después de cada dosis se realizó una extracción de sangre por vía retro-orbital y se evaluó por ELISA la respuesta de IgG específica anti-HBcAg en suero. Junto con la extracción final se realizaron lavados pulmonares y vaginales, en los cuales se evaluó por ELISA la respuesta de IgA específica anti-HBcAg. Las variantes ensayadas se describen a continuación (Esquema B):

- I. Grupo 1: 5 µg de HBcAg en PBS vía IP
- II. Grupo 2: 5 µg de HBcAg en PBS vía IN
- III. Grupo 3: 5 µg de HBcAg en PBS vía Oral.
- IV. Grupo 4: 5 µg de HBcAg en PBS vía SL
- V. Grupo 5: 5 µg de HBcAg en PBS vía IVag.
- VI. Grupo 6: 5 µg de HBcAg en PBS vía IR
- VII. Grupo 7: 5 µg de HBcAg en PBS vía SC
- VIII. Grupo 8: PBS vía IP

3.13.4 Estudio de la respuesta inmune inducida en ratones Balb/c por formulaciones combinadas del HBcAg y el HBsAg inoculadas por vía IN

Se estudió el efecto de la coadministración del HBcAg (variante HBcM492) sobre la inmunogenicidad del HBsAg por vía IN, en comparación con otras formulaciones del HBsAg adyuvadas con Acemanano –manósido acetilado derivado de la planta Aloe barbadensis, previamente utilizado como adyuvante nasal en nuestro departamento- o sin adyugar (en PBS). Se inocularon 6 grupos de 8 ratones. Las administraciones se realizaron los días 0 y 14. La extracción se realizó el día 24. Las variantes estudiadas fueron las siguientes (Esquema A):

- I. Grupo 1: 10 µg de HBsAg en PBS, vía IN
- II. Grupo 2: 10 µg de HBsAg en Acemanano (3 mg/mL), vía IN
- III. Grupo 3: 10 µg de HBsAg / 10 µg de HBcAg en PBS, vía IN.
- IV. Grupo 4: 10 µg de HBsAg en ALOOH (0,5 mg/mL), vía SC
- V. Grupo 5: 10 µg de HBcAg en PBS, vía IN
- VI. Grupo 6: ALOOH (0,5 mg/mL), vía SC

En un segundo estudio de formulaciones combinadas de los antígenos de la superficie y de la nucleocápsida del VHB se comparó la inmunogenicidad del HBsAg en formulaciones que contienen al HBcAg (variante HBcM492) con la inmunogenicidad inducida por otras formulaciones del HBsAg, entre ellas la formulación adyuvada con TC –adyuvante mucosal mejor estudiado en modelos animales- por vía IN y la formulación con ALOOH por vía IP.

Para cumplimentar el objetivo propuesto se inmunizaron 9 grupos de 8 ratones a los que se les suministraron dos dosis de diferentes formulaciones antigénicas, los días 0 y 22. Las extracciones se realizaron diez días después de cada inoculación. En este estudio la administración parenteral del HBsAg adyuvado en ALOOH se realizó por vía IP. Los grupos ensayados fueron los siguientes (Esquema B):

- I. Grupo 1: 1 µg de TC en PBS, vía IN
- II. Grupo 2: 5 µg de TC en PBS, vía IN
- III. Grupo 3: 1 µg de HBcAg en PBS, vía IN.
- IV. Grupo 4: 5 µg de HBcAg en PBS, vía IN
- V. Grupo 5: 5 µg de HBcAg / 5 µg de HBsAg, vía IN
- VI. Grupo 6: 5 µg de HBsAg / 1 µg de TC, vía IN
- VII. Grupo 7: 5 µg de HBsAg / Acemanano (3 mg/mL), vía IN
- VIII. Grupo 8: 5 µg de HBsAg en PBS, vía IN
- IX. Grupo 9: 5 µg de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía IP

Se estudió del efecto de dos variantes del antígeno de la nucleocápsida del VHB (variantes HBcM492 y HBcRIV-2), sobre la inmunogenicidad del HBsAg, cuando estos antígenos son administrados en formulaciones nasales combinadas.

Un total de 7 grupos de 8 ratones fueron inoculados con diferentes formulaciones antigénicas los días 0 y 14. Las extracciones se realizaron los días 10 y 24. Los inmunógenos administrados por vía IN fueron el HBcAg (variantes HBcM492 y HBcRIV-2) y el HBsAg, estos antígenos se administraron de forma independiente en

PBS o se coadministraron con el HBsAg. Por vía parenteral (SC) se administró igual dosis de HBsAg (5 µg) adyuvado con ALOOH a una concentración final de 0,5 mg/mL. Como placebo se usó un grupo en el que los ratones recibieron PBS por vía IN. Las variantes estudiadas fueron las siguientes (Esquema C):

- I. Grupo 1: 10 µg de HBcAg (variante HBcRIV-2) en PBS, vía IN.
- II. Grupo 2: 10 µg de HBcAg (variante HBcM492) en PBS, vía IN.
- III. Grupo 3: 10 µg de HBcAg (variante HBcRIV-2) / 5 µg de HBsAg en PBS, vía IN.
- IV. Grupo 4: 10 µg de HBcAg (variante HBcM492) / 5 µg de HBsAg en PBS, vía IN.
- V. Grupo 5: 5 µg de HBsAg en PBS, vía IN
- VI. Grupo 6: 5 µg de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía SC
- VII. Grupo 7: PBS vía IN

Con el objetivo de estudiar el efecto del HBcAg sobre la inmunogenicidad del HBsAg a diferentes dosis y estudiar la duración de este efecto en el tiempo, se emplearon 7 grupos de 6 ratones, los que fueron inoculados con diferentes formulaciones del HBsAg. En tres grupos el HBsAg fue coadministrado con la variante HBcAg (HBcM492). El HBcAg se evaluó a tres niveles de dosis combinado con una misma dosis del HBsAg. El esquema que se siguió fue de 3 inoculaciones los días 0, 14 y 28, y las extracciones se realizaron los días 26, 42, 150 y 270. Los grupos ensayados fueron (Esquema D):

- I. Grupo 1: 5 µg de HBsAg en PBS, vía IN;
- II. Grupo 2: 5 µg de HBsAg / 5 µg de HBcAg en PBS, vía IN
- III. Grupo 3: 5 µg de HBsAg / 10 µg de HBcAg en PBS, vía IN
- IV. Grupo 4: 5 µg de HBsAg / 20 µg de HBcAg en PBS, vía IN
- V. Grupo 5: 5µg de HBsAg en Acemanano (0,3mg/mL) vía IN
- VI. Grupo 6: 5µg de HBsAg en ALOOH (0,5mg/mL) vía IM.

Se realizó un estudio del patrón de subclases de IgG generado en suero y de las características de la respuesta inmune celular inducida por la formulación combinada HBsAg: HBcAg. Cinco grupos de 10 ratones fueron inoculados con las distintas formulaciones los días 0, 14, 28 y 90. Las extracciones de sangre se efectuaron 10 días después de cada inoculación y los estudios de respuesta celular se realizaron el día 42. Los grupos de estudio fueron (Esquema E):

- I. Grupo 1: 5 µg de HBsAg en PBS, vía IN.
- II. Grupo 2: 5 µg de HBsAg / 5 µg de HBcAg (HBcM492), vía IN.

- III. Grupo 3: 5 µg de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía IM.
- IV. Grupo 4: 5 µg de HBcAg (HBcM492), vía IN.
- V. Grupo 5: PBS, vía IN

Para examinar el comportamiento de la respuesta de subclases de IgG en una segunda línea de ratones con diferente haplotipo, se desarrolló un protocolo similar en ratones C57/B16.

3.13.5 Evaluación del efecto adyuvante del HBcAg sobre una variante del antígeno de superficie obtenido en células de mamíferos

Se desarrolló un estudio de inmunogenicidad con el objetivo de conocer el efecto del HBcAg sobre la variante de antígeno de superficie HBsAg-BB, producido en células de mamíferos por una compañía europea (Berna Biotech, Suiza), cuando ambos antígenos son coadministrados. Esta variante del antígeno de superficie del VHB contiene la proteína S, así como las regiones pre-S1 y pre-S2 ensambladas en partículas de 22 nm. El estudio de inmunogenicidad se realizó en 7 grupos de 8 ratones inoculados los días 0, 15, 30 y el suero se colectó diez días después de cada inoculación. Se emplearon en este estudio las rutas IM e IN. El esquema de inmunización contó con los siguientes grupos:

- I. Grupo 1: 5 µg de HBsAg (CIGB) en ALOOH (0,5 mg/mL), vía IM.
- II. Grupo 2: 5 µg de HBsAg (CIGB) en PBS, vía IN.
- III. Grupo 3: 5 µg de HBsAg (CIGB) / 10 µg de HBcAg (HBcM492), vía IN.
- IV. Grupo 4: 5 µg de HBsAg-BB, en ALOOH (0,5 mg/mL), vía IM
- V. Grupo 5: 5 µg de HBsAg-BB, en PBS, vía IN
- VI. Grupo 6: 5 µg de HBsAg-BB / 10 µg de HBcAg (HBcM492), vía IN
- VII. Grupo 7: 5 µg de HBcAg (variante HBcM492) en PBS, vía IN

3.13.6 Estudio de la respuesta inmune generada en ratones Balb/c por la administración de formulaciones combinadas del HBsAg y otros antígenos de interés vacunal

Entre los antígenos vacunales que frecuentemente son coadministrados con el HBsAg en formulaciones vacunales se encuentran los toxoides TD y TT, así como la bacterina de *Bordetella pertussis* (Bp). Estos antígenos se evaluaron en formulaciones combinadas con el HBsAg para conocer el efecto de estas combinaciones sobre la inmunogenicidad por

vía IN de los antígenos presentes en las formulaciones. Para ello se inocularon 13 grupos de ratones por las rutas IN ó IP.

Es de notar que se inocularon 2 grupos control por vía IP, uno con una formulación del HBsAg en ALOOH, así como con una formulación tetravalente que contiene todos estos antígenos. Es bueno destacar que en el grupo control administrado por vía IP (grupo 13), las cantidades de TD, TT y Bp son superiores a las que se utilizaron por vía IN ya que estas dosis son las que se corresponden con la dosis equivalente de 5 µg del HBsAg en la formulación comercial tetravalente Trivac HB. El esquema de inmunización contó con 4 inoculaciones los días 0, 14, 28 y 90, las extracciones se realizaron 2 semanas después de la tercera dosis y los lavados se realizaron junto con una extracción final el día 100 de iniciado el estudio. Las variantes ensayadas fueron (Esquema A):

- I. Grupo 1: 5µg de HBsAg / 10µg de TD, vía IN
- II. Grupo 2: 5µg de HBsAg / 3,2 Unidades de opacidad (UOP) de Bp, vía IN
- III. Grupo 3: 5µg de HBsAg / 10µg de TT, vía IN
- IV. Grupo 4: 5µg de HBsAg / 10µg de TD / 3,2 UOP de Bp, vía IN
- V. Grupo 5: 5µg de HBsAg / 10µg de DT / 10µg de TT , vía IN
- VI. Grupo 6: 5µg de HBsAg / 3,2 UOP de Bp / 10µg de TT, vía IN
- VII. Grupo 7: 5µg de HBsAg / 10µg de DT / 10µg de TT / 3,2 UOP de Bp, vía IN
- VIII. Grupo 8: 5µg de HBsAg, vía IN
- IX. Grupo 9: 10µg de DT, vía IN
- X. Grupo 10: 3,2 UOP de Bp, vía IN
- XI. Grupo 11: 10µg de TT, vía IN
- XII. Grupo 12: 5µg de HBsAg / ALOOH 0,5 mg/mL, vía IP
- XIII. Grupo 13: 5µg de HBsAg / 49,26 µg de DT / 29,07 µg de TT / 8,0 UOP de Bp en ALOOH 0,5 mg/mL, vía IP.

En un segundo estudio de inmunogenicidad se evaluaron formulaciones combinadas del HBsAg y la proteína de la nucleocápsida del VHC. Las formulaciones combinadas, y sus respectivos controles, se inocularon por vía IN o IM. En el estudio se emplearon 6 grupos de 10 ratones. Las inoculaciones fueron los días 0, 14 y 28 y las extracciones se realizaron al inicio del estudio y el día 42.

Los grupos ensayados fueron (Esquema B):

- I. Grupo 1: 10 µg HCcAg en PBS, vía IN

- II. Grupo 2: 5 µg HBsAg en PBS, vía IN
- III. Grupo 3: 10 µg HCcAg / 5 µg HBsAg en PBS, vía IN
- IV. Grupo 4: 10 µg HCcAg en ALOOH 0,5 mg/mL, vía IM
- V. Grupo 5: 5 µg HBsAg en ALOOH 0,5 mg/mL, vía IM
- VI. Grupo 6: 10 µg HCcAg / 5 µg HBsAg en ALOOH 0,5 mg/mL, vía IM
- VII. Grupo 7: ALOOH, vía IM

3.13.7 Evaluación de la respuesta inmune inducida en voluntarios saludables inmunizados con la formulación nasal combinada de HBsAg y HBcAg.

Se desarrolló un estudio clínico como protocolo fase I, controlado, aleatorizado y a doble ciegas, en el cual se evaluó la seguridad y la inmunogenicidad preliminar de la administración IN de 50 µg de los antígenos HBsAg y HBcAg, en un volumen de 500 µL. La composición de la formulación utilizada se describe en la Tabla 2. El estudio clínico fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Militar y se condujo según las Buenas Prácticas Clínicas.

Un total de 19 voluntarios saludables, de sexo masculino y con edades comprendidas entre los 18 y 45 años fueron seleccionados luego de un riguroso proceso que incluyó el estudio de su historia médica y sus antecedentes patológicos personales, un examen físico riguroso y exámenes serológicos para la detección de anticuerpos específicos anti-HBsAg y anti-HBcAg. Adicionalmente, se evaluó la presencia del HBsAg en el suero de los voluntarios y se tuvo en cuenta que los resultados de los exámenes de hematología básica y química clínica se encontraran dentro del rango de la normalidad.

Entre los criterios de exclusión en el estudio, se consideró la presencia de signos o síntomas de alguna enfermedad aguda o crónica de las vías respiratorias, la existencia de alguna enfermedad descompensada, la vacunación previa contra la hepatitis B o la presencia de alguno de sus marcadores serológicos. Los voluntarios con enfermedades agudas o crónicas de las vías respiratorias y senos perinasales: rinofaringitis aguda catarral, desviaciones del septum nasal, rinitis alérgica, sinusitis, pólipos nasales, faringitis, bronquitis, asma bronquial así como aquellos con antecedentes de amigdalectomía o adenoidectomía u otras intervenciones quirúrgicas realizadas sobre el complejo anatómico rino-sinusal fueron descartados. También se consideró como un criterio de exclusión la presencia de alguna enfermedad inmunosupresora subyacente, ingestión de drogas inmunosupresoras (incluyendo esteroides) o medicamentos

inmunoestimuladores (interferón, gammaglobulinas, factor de transferencia, levamisol) actual o en los seis meses previos al estudio. Adicionalmente fueron descartados aquellos voluntarios con fiebre (temperatura mayor o igual a 37.8°C) en el momento o 24 horas antes de la vacunación, la presencia de antecedentes alérgicos severos y la existencia previa de reacciones adversas serias a otras vacunas.

Con posterioridad a la aprobación del protocolo clínico por parte de las autoridades regulatorias, un total de 9 voluntarios recibieron el candidato vacunal y 10 recibieron solución salina (NaCl, 0,9 %). Los pacientes fueron inoculados los días 0, 7, 15, 30 y 60, utilizando el dispositivo Accuspray (Becton-Dickinson, EUA) en cuatro aplicaciones nasales de 125 µL, 2 descargas de este dispositivo en cada fosa nasal. Las extracciones de sangre se realizaron los días 30 y 75. Un total de 17 voluntarios culminaron el estudio, 8 de ellos en el grupo de estudio y el resto en el grupo control. Los grupos del estudio fueron:

- I. Grupo 1: 50 µg de HBsAg / 50 µg de HBcAg (HBcM492) en PBS, vía IN
- II. Grupo 2: Solución salina fisiológica (NaCl 0.9%)

Se consideró como criterio de fracaso la aparición de alguna reacción adversa grave en cualquiera de los sujetos vacunados con la formulación en estudio.

La evaluación de los eventos adversos después de aplicar cada dosis de la vacuna se realizó por recolección de la información referida por el voluntario en la entrevista médica, interrogatorio, examen físico y a través de la observación clínica estrecha. Para ello, la reactogenicidad se evaluó luego de cada dosis: a la hora de aplicado el producto, así como a las 6, 12, 24, 48 y 72 horas posteriores a la vacunación. Las dos primeras dosis de vacuna fueron aplicadas bajo régimen de ingreso hospitalario de 24 horas. En cada observación se registró la temperatura axilar del sujeto y demás signos vitales, realizándose un examen físico general e inspección detallada de las fosas nasales, así como rinoscopia anterior si el voluntario refiere alguna molestia o se observa cualquier signo/síntoma de irritación local. Los eventos adversos se registraron en los cuadernos de eventos adversos de forma activa y en todos los casos por médicos especialistas.

Se enfatizó en la búsqueda de eventos y reacciones adversas locales (rinitis, obstrucción nasal, eritema nasal, epistaxis, faringitis, etc.) y sistémicas (fiebre, malestar general, cefalea, fatiga, síntomas gastrointestinales). Los síntomas se catalogaron como: ausentes

(cuando no estuvieron presentes), leves (molestia que no interfirió en una manera significativa con el nivel de funcionamiento normal del sujeto), moderado (molesto y que produce cierta limitación del funcionamiento pero no es peligroso para la salud, o grave (causante daño significativo al funcionamiento del sujeto o incapacidad y que es definitivamente peligroso para su salud). La fiebre se definió como una temperatura axilar por encima de los 37.4 °C y se consideró ligera (37.5-38°C), moderada (38.1-39°C) o grave (>39°C).

La inmunogenicidad de la formulación en estudio se evaluó por UMELISA (Centro de Inmunoensayos, Cuba). Se emplearon los sistemas comerciales establecidos para determinar los niveles de anticuerpos totales anti-HBs y anti-HBc en los sueros de los voluntarios. Se evaluaron las muestras de suero de la extracción preinmune así como aquellas obtenidas a partir de las extracciones los días 30 y 75. Los niveles de anticuerpos anti-HBsAg se cuantificaron tomando como referencia un patrón internacional, según el cual, los niveles de anticuerpos por encima de 10 UI/L se consideran protectores, estableciendo este valor como límite de seroprotección. La reactividad positiva al HBcAg se consideró como seroconversión, teniendo en cuenta que este ensayo se utiliza para la detección de anticuerpos anti-HBcAg en pacientes que han padecido la enfermedad en base a si existe o no respuesta anti-HBcAg.

En el presente trabajo de tesis se abordarán a profundidad los aspectos relacionados con la inmunogenicidad de la formulación cuando se administra en humanos dado que este aspecto está directamente relacionado con la prueba del concepto de que una formulación nasal puede inducir respuesta protectora por vía nasal. Los resultados de seguridad de esta preparación sólo serán considerados desde el punto de vista cualitativo teniendo en cuenta que los mismos formarán parte de un trabajo de tesis especializado en el tema.

3.13.8 Evaluación de la respuesta inmune inducida por la mezcla del HBsAg y del HBcAg por vía parenteral en diferentes formulaciones.

Se evaluó el efecto del HBcAg sobre la inmunogenicidad del HBsAg cuando el mismo se coadministró en PBS, ALOOH, γ -inulina y en varias formulaciones de Algamulina. Un total de 13 grupos de 8 ratones fueron inoculados con las diferentes preparaciones por la ruta intramuscular. Adicionalmente, se emplearon tres grupos de 5 ratones a los que se les

administraron 3 formulaciones placebo que no contenían al HBsAg. Las formulaciones fueron inoculadas por vía IM los días 0 y 28 y las extracciones se realizaron antes del inicio y el día 56. Los grupos ensayados fueron los siguientes:

- I. Grupo 1: Heberbiovac HB (100 μ L, 2 μ g de HBsAg), vía IM.
- II. Grupo 2: 2 μ g de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía IM.
- III. Grupo 3: 2 μ g de HBsAg en Algamulina (AG48), vía IM.
- IV. Grupo 4: 2 μ g de HBsAg en Algamulina (AG52), vía IM.
- V. Grupo 5: 2 μ g de HBsAg en Algamulina (AG53c), vía IM.
- VI. Grupo 6: 2 μ g de HBsAg en γ -Inulina, vía IM
- VII. Grupo 7: 2 μ g de HBsAg en PBS, vía IM
- VIII. Grupo 8: 2 μ g de HBsAg / 4 μ g de HBcAg (HBcM492) en ALOOH, vía IM
- IX. Grupo 9: 2 μ g de HBsAg / 4 μ g de HBcAg (HBcM492) en AG48, vía IM
- X. Grupo 10: 2 μ g de HBsAg / 4 μ g de HBcAg (HBcM492) en AG52, vía IM
- XI. Grupo 11: 2 μ g de HBsAg / 4 μ g de HBcAg (HBcM492) en AG53c, vía IM
- XII. Grupo 12: 2 μ g de HBsAg / 4 μ g de HBcAg (HBcM492) en γ -Inulina, vía IM
- XIII. Grupo 13: 2 μ g de HBsAg / 4 μ g de HBcAg (HBcM492) en PBS, vía IM
- XIV. Grupo 14: AG48, vía IM
- XV. Grupo 15: HBcAg, vía IM
- XVI. Grupo 16: AG48 + HBcAg, vía IM

3.13.9 Estudio de la inmunogenicidad de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg en ratones transgénicos HBsAg (+)

Con el objetivo de evaluar si la respuesta inmune inducida por la combinación de los antígenos de superficie y de la nucleocápsida del VHB es capaz de subvertir la tolerancia inmunológica al HBsAg en ratones transgénicos HBsAg (+), se realizó un estudio de inmunogenicidad en el que se emplearon formulaciones combinadas de los antígenos del VHB por las rutas IN y SC en ratones transgénicos HBsAg (+). Un grupo de ratones Balb/c -no transgénicos-, fue inoculado con las mismas formulaciones, dosis y rutas de inmunización como control. Los ratones transgénicos utilizados se obtuvieron en el CIGB y se caracterizan por su expresión estable del HBsAg en sangre y en diferentes órganos. Los ratones transgénicos HBsAg (+) y los ratones Balb/c, ambos de sexo femenino y de 8 a 14 semanas de edad, fueron sometidos a una serie de inmunizaciones, realizadas con un intervalo de tiempo de dos semanas entre inoculaciones. Por la ruta IN se inoculó la formulación combinada que tiene como base la mezcla de ambos antígenos en PBS y por

la vía SC se utilizó la misma formulación adsorbida al gel de ALOOH (0,5 mg/mL), administrando una dosis de 5 µg de cada antígeno, por ratón y por cada ruta. Las administraciones IN y SC se realizaron de modo simultáneo. Los sueros fueron colectados a los 10 días de la 3ra, 5ta, 6ta y 7ma inoculaciones.

Las variantes experimentales administradas fueron:

I. Grupo 1: 8 Ratones transgénicos HBsAg(+) y II. Grupo 2: 8 Ratones Balb/c normales:

Vía Intranasal: 5 µg de HBsAg / 5 µg de HBcAg en PBS

Vía Subcutánea: 5 µg de HBsAg / 5 µg de HBcAg en ALOOH 0.5 mg/mL

III. Grupo 3: 8 Ratones transgénicos HBsAg(+) y IV Grupo 4: 8 Ratones Balb/c:

Vía Intranasal: PBS

Vía Subcutánea: ALOOH

3.14 Métodos analíticos

3.14.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales en los extractos de ruptura se determinó según el método del ácido bicínico (124). En el caso de las muestras de mayor pureza, la determinación se realizó según la técnica descrita por Lowry y colaboradores (125).

3.14.2 Electroforesis en gel de agarosa

La electroforesis en gel de agarosa se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook y colaboradores (118).

3.14.3 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

La electroforesis se realizó en gel del 12% de poliacrilamida. Se realizó según la técnica descrita por Laemli (126). Las muestras se prepararon en condiciones de reducción y desnaturalización mediante calentamiento a 100 °C durante 20 min en una solución tampón (Tris-HCl 1,21 g/L, EDTA 0,29 g/L, SDS 10 g/L, β-mercapto-etanol 5%, glicerol 20%, pH 8,0). Se aplicó un total de 10 µg de proteína por muestra.

3.14.4 Tinción de geles de electroforesis de proteínas con Coomassie azul R-250

La tinción del gel se realizó durante una hora a temperatura ambiente en la solución de tinción (30% de metanol, 10% de ácido acético y 1 g/L de colorante azul Coomassie R 250). Posteriormente, se eliminó el colorante mediante tratamiento con una solución con igual composición que la anterior (excepto en que no contenía colorante), hasta obtener una buena resolución de las bandas proteicas sobre el fondo transparente.

3.14.5 Inmunodetección mediante “Western blot”

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa de 0,45 μm , según Towbin y colaboradores (127). La inmunodetección se realizó según lo reportado anteriormente (128). Brevemente, los filtros fueron bloqueados con BSA al 3% en PBS, durante 1 h a 37 °C. Después de lavarlos tres veces con PBS, éstos fueron incubados con un anticuerpo monoclonal específicos para las proteínas HBcAg (CIGB, Cuba), durante 1 h a 37 °C. Posteriormente, los filtros se incubaron con los conjugados de proteína A-peroxidasa durante 1 h y la reacción inmunológica se reveló utilizando como sustrato una solución de H₂O₂ que contenía amino-etil-carbazole (AEC) a 1 mg/mL en acetato de sodio, como cromógeno. La reacción fue detenida lavando los filtros con agua destilada.

3.14.6 Método para el estudio del reconocimiento de epítopes lineales

En el mapeo de epítopes lineales se realizó de acuerdo a un método previamente reportado (129) para el análisis del reconocimiento de epítopes presentes en péptidos lineales conjugados a membranas de celulosa. Se evaluaron sueros y lavados vaginales de ratones inmunizados con las dos variantes de la proteína HBcAg, se emplearon 31 péptidos secuenciales y sobrelapados en 6 aa del HBcAg (variante HBcRIV-2). Para hidratar la membrana se realizaron 2 lavados de 2 min con metanol y 3 lavados de 10 min con 0,05 % de Tween 20 en tampón Tris-hidroximetil aminometano (Tris) salino (Tris 1 M, NaCl 5 M, pH 7,0) (TBS-T). La membrana se bloqueó usando una solución de leche descremada al 5% en Tris 1 M, NaCl 5 M, pH 7,0 y se incubó toda la noche a 4°C. Posteriormente, la membrana se incubó por 3 h a 23 °C con un suero del ensayo, diluido en una solución de 5 % de leche descremada y 0,5 % de Tween 20. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-T. Transcurrido ese tiempo se incubó la membrana con el conjugado anti-IgG de ratón fosfatasa alcalina (Amersham, Inglaterra) a una dilución 1:3000 en la misma solución, durante 1h a TA.

Durante la evaluación de los lavados vaginales se incubó 2h a TA con el conjugado anti-IgA-biotina diluido 1:500, luego se incubó 1h con el conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina a una dilución 1:1000. Después de cada paso se realizaron 4 lavados de 5 min de duración con TBS-Tween 20. Finalmente, se añadió la solución sustrato, compuesta por Tris 0,1 M, MgCl₂ 2 mM, NaCl 0.1 M, pH 8,9. A 5 ml de esta solución se añaden 30 μl

de BCIP (5-bromo 4-cloro 3-indoil fosfato) (Sigma, EUA), preparado a 50 mg/ml en N,N´dimetil-formamida (DMF) y 50 µl de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2 il) 2,5 difenil tetrasodio bromuro) (Sigma, EUA). A los 10 min se detuvo la reacción lavando la membrana con PBS. Los resultados obtenidos fueron fotografiados.

Para la reutilización de la membrana, los anticuerpos fueron removidos al terminar cada ensayo según el siguiente procedimiento: Se lavó la membrana 2 veces con agua destilada por 5 min, Seguidamente se realizaron 3 lavados con DMF, el último de ellos en baño ultrasónico Aquasonic (VWR, EUA) a una frecuencia de 9 Hz a 23 °C, hasta que desapareció el color. A continuación se realizaron 3 lavados con agua destilada y se puso la membrana en baño ultrasonico embebida en una solución que contiene 8 M urea, SDS 1 %, β mercaptoetanol 0,1 %, a 40 °C, empleándose 3 ciclos de 5 min. Luego se lavó 3 veces por 5 min con una solución de Acido acético al 10 % y etanol al 25 %. Finalmente se realizaron 2 lavados con etanol absoluto. Al término del proceso de regeneración de los péptidos la membrana se secó y se guardó a 4 °C en una bolsa plástica hasta el nuevo el procedimiento de mapeo.

3.14.7 Microscopía electrónica de transmisión

Esta técnica se utilizó en la caracterización de la proteína HBcM492 y de la formulación de esta proteína y el HBsAg. La técnica se desarrolló según el procedimiento descrito por Falcón y colaboradores (130). Brevemente, 15 µl de muestra (HBcM492, HBsAg y la mezcla de ambas proteínas) se colocaron sobre las rejillas de cobre (400 mesh), recubiertas de formvar-carbón, en el evaporador a vacío (JEOL-JEE-4X, Japón) previamente desionizadas durante 3 min (JEOL-Ion, Japón). Posteriormente, las rejillas se incubaron por 30 s con una solución de acetato de uranilo al 1% y después de lavadas con agua bidestilada estas fueron secadas. Se analizaron las partículas semejantes a virus provenientes de las diferentes muestras. Por cada muestra se tomaron 3 campos aleatorios por rejillas y se observaron varios cientos de cada una de las partículas.

Las muestras fueron visualizadas utilizando la microscopía electrónica de transmisión. La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 2000 EX, Japón) con aceleración de voltaje de 80 a 100 kV y amplificación entre 50 000 y 100 000 veces.

3.14.8 Determinación de la homogeneidad molecular del HBcAg purificado por cromatografía líquida de alta resolución

Para controlar la homogeneidad molecular del HBcAg sobre la base de la relación entre el peso molecular (tamaño) y el tiempo de retención se realizó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) a muestras del antígeno de la nucleocápsida y a su formulación líquida con el HBsAg en una columna TSK G5000 PW (7.5 x 600 mm) (Tosohaas, Japón). El flujo utilizado (0,25 mL/min) se obtuvo con una bomba L7110 (Merck-Hitachi, Japón) y la detección de los antígenos se realizó a la longitud de onda de trabajo de 280 nm con un detector UV L7400 (Merck-Hitachi, Japón). La solución de corrida fue la solución tampón fosfato-salina. Como interfase para la adquisición de datos y el análisis de los tiempos de retención se utilizó el programa Biocrom (CIGB, Cuba).

3.14.9 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida

Los ensayos de ELISA se realizaron según un procedimiento desarrollado previamente (131). Brevemente, las placas de ELISA (Costar, EUA) fueron recubiertas con 100 µl del antígeno (entre ellos el HBsAg, el HBcAg, y demás antígenos ensayados) a 5 µg/mL, diluidos en solución de recubrimiento (solución tampón carbonato 50 mM, pH 9.6) a 4 °C durante 12 h. Las placas fueron lavadas cuatro veces con solución de PBS 1X, que contiene 0,05 % Tween 20 (PBS-Tween). Después de bloquear la placa con 2 % de leche descremada en PBS, las diluciones 1:10; 1:100; 1:1000 y 1:10 000 de los sueros ensayados en PBS-Tween con leche al 2 % fueron añadidas en las placas previamente recubiertas e incubados durante 1 h a 37°C. Después de lavar las placas, los anticuerpos de tipo IgG fueron detectados por la adición del conjugado de inmunoglobulinas específicas anti-IgG de ratón conjugadas a peroxidasa (Sigma, EUA) a una dilución 1:5000 en PBS-Tween con leche al 2 %. La incubación se realizó durante 1 h a 37°C. Después de lavar las placas, el sustrato H₂O₂ + ortofenilendiamina (Sigma, EUA), diluido a 1 mg/mL en solución tampón de sustrato, fue usado para revelar la reacción antígeno-anticuerpo y la DO fue leída a los 15 min a una longitud de onda de 492 nm. En el experimento de determinación de las subclases de IgG, se incubó con los anticuerpos biotinilados anti-IgG1, anti-IgG2a y anti-IgG2b (Amersham, Inglaterra), durante 1 hora a 37 °C. Después se incubó con un conjugado estreptavidina-peroxidasa (Amersham, Inglaterra) por 1 hora a 37°C. Los 3 conjugados fueron utilizados a una dilución de

trabajo de 1:5000. Por último, el revelado y la lectura se realizaron como en el procedimiento anterior.

En la evaluación de los lavados mucosales, las diluciones de los lavados fueron ensayadas en lugar del suero y el conjugado utilizado tuvo afinidad para la detección de anticuerpo de isotipo IgA por ser este el isotipo predominante en lugar del isotipo IgG predominante en suero. Se utilizó una dilución de 1:10 para la evaluación de las muestras. El resto del ELISA siguió el mismo procedimiento previamente descrito.

Los títulos se definen como el valor de dilución al cual la reacción inmunoenzimática se hace negativa. Se tomó como criterio de positividad los valores de DO de las muestras superiores en dos veces o más a los valores de DO obtenidos en los controles negativos. Para la representación gráfica de los títulos se utilizó el logaritmo decimal de los valores de las medias geométricas y de los intervalos de confianza para un 95 % de probabilidades. Cuando un grupo no indujo respuesta de anticuerpos detectable, se representó por un guión en la mínima dilución ensayada.

3.14.10 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida para la determinación de IFN- γ en sobrenadantes de cultivos celulares

Las células del bazo (esplenocitos) de los ratones inmunizados fueron colectadas y diluidas en RPMI 1640 (Gibco, Inglaterra), que contiene estreptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina (100 U/mL) y 2 β -mercaptoetanol (50 μM), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). La densidad celular fue ajustada a 2×10^5 células/pocillo en presencia de 1-5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /pocillo de cada antígeno, o el control negativo de acuerdo al experimento. Como control mitogénico positivo se utilizó la Concanavalina A a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además se utilizaron controles de células que no recibieron ninguna estimulación. Las células en todos los pocillos fueron cultivadas en 220 μL de medio. Las placas fueron incubadas en atmósfera húmeda a 37°C y CO₂ al 5%, durante 36 h. Al cabo de este tiempo el sobrenadante fue colectado y guardado a -20°C hasta su evaluación mediante la técnica de ELISA. El método de detección mediante ELISA se basa en un sistema desarrollado para la determinación de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo (R & D Systems, EUA) de acuerdo a lo reportado anteriormente (**131**). Se mantiene el criterio de positividad del ELISA, considerando positivos aquellos valores de las muestras cuya DO promedio sea 2 veces superior a la de sus controles negativos.

3.14.11 Ensayo de proliferación linfocitaria

La respuesta linfoproliferativa se determinó según lo reportado por Alvarez-Obregón y colaboradores (132). Las células del bazo (esplenocitos) de los ratones inmunizados (n=3), fueron colectadas y diluidas en RPMI 1640 (Gibco, Inglaterra), que contiene estreptomycin (100 µg/mL), penicilina (100 U/mL) y β-mercaptoetanol (50 µM), suplementado con 10% de SFB. La densidad celular fue ajustada a 2×10^5 células/pocillos en presencia de 1-5 µg/mL de cada antígeno por pocillo, o sus controles negativos de acuerdo al experimento. Como control positivo se utilizó Con A a 10 µg/mL. Además se utilizaron controles de células que no recibieron ninguna estimulación. Las células en todos los pocillos fueron cultivadas en 220 µL de medio. Las placas fueron incubadas en atmósfera húmeda a 37°C y CO₂ al 5%, durante 72 h. Las células fueron pulsadas con timidina-tritiada (1 µCi/pocillo)-(Amershan-Pharmacia-Biotech, Inglaterra), durante las últimas 16 h de cultivo y posteriormente cosechadas en filtros (Pharmacia, Suecia). La radioactividad incorporada fue determinada usando un contador de centelleo líquido, modelo Rackbeta 1217 (LKB/Wallac, Suecia). El índice de estimulación (IE) fue calculado dividiendo los conteos por minutos de las células estimuladas por el promedio de los conteos por minuto de los pocillos controles. Se tomó como criterio de positividad del ensayo los valores de IE iguales o superiores a tres. Todas las muestras fueron tratadas por triplicado. Los ensayos se replicaron al menos tres veces. Se representa gráficamente el resultado típico del ensayo de proliferación.

3.14.12 Método para determinar la frecuencia de células secretoras de IFN-γ mediante ELISPOT

La determinación de la frecuencia de células secretoras de IFN-γ mediante ELISPOT se basó en un método descrito por Sun y colaboradores (133).

Preparación de las células presentadoras y efectoras

Diez días después de la última inmunización fueron sacrificados de 3 a 5 animales por grupo, sus bazo fueron extraídos asépticamente y macerados. Los eritrocitos presentes en la preparación fueron lisados después de 5 minutos de incubación con 0,83% de NH₄Cl. Posteriormente, las células fueron lavadas varias veces, resuspendidas en medio completo RPMI 1640 (Gibco, EUA) suplementado con 10% de SFB, glutamina 2mM, piruvato de sodio 2mM, 2-mercaptoetanol 50mM y antibióticos) y contadas.

Por otro lado, células p815 provenientes de un mastocitoma H-2^d fueron incubadas en medio completo con 10 μM del péptido S₍₂₈₋₃₉₎ del HBsAg (secuencia IPQSLDSWWTSL) por 1h a 37°C y en una atmósfera del 5% de CO₂. Luego de este período de incubación las células p815 fueron incubadas por otros 15 minutos con mitomicina C (Sigma, EUA). Posteriormente, las células fueron lavadas extensivamente para evitar los restos de mitomicina C, resuspendidas en medio completo y contadas. Paralelamente, células p815 recibieron el mismo tratamiento pero sin el péptido para ser usadas como controles negativos del experimento.

Restimulación in vitro de células CTL

Después de varios pasos de lavado, las células del bazo fueron contadas y distribuidas a razón de 2×10^6 células/mL en frascos de cultivo de 25cm² y estimuladas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del péptido S₍₂₈₋₃₉₎. Después de ser cultivadas por 4 días, la mitad del medio de cultivo fue sustituido por medio nuevo al que se adicionó 2×10^4 U/ml de IL2. Al séptimo día las células fueron colectadas y contadas. Subsecuentemente, 10^4 y 5×10^4 células por pozo fueron adicionadas a 10^5 células p815 previamente estimuladas con el mismo péptido por 1h. Como control positivo del experimento se empleó la ConA a una concentración de 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ por pozo. Como control negativo para cada grupo analizado se usaron las células de bazo incubadas con células p815 sin pulsar previamente con el péptido, además se usó un control negativo de células provenientes de animales no inmunizados.

Ensayo de ELISPOT

Las placas de 96 pocillos de ELISPOT recubiertas con nitrocelulosa (Millipore, EUA) fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo monoclonal anti-INF- γ R4-6A2 (Pharmingen, EUA). Las placas fueron lavadas 3 veces y bloqueadas con medio completo por 1h a 37°C. Tres diluciones (2×10^5 , 1×10^5 y 0.5×10^5) de esplenocitos recientemente aislados o restimulados y 1×10^5 células p815 estimuladas fueron incubadas por 20 h a 37 °C y en atmósfera de 5 % de CO₂. Como controles negativos se usaron células p815 sin pulsar con el péptido y como controles positivos los esplenocitos fueron incubados con 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Con A.

Las placas fueron lavadas tres veces con PBS y 5 veces con PBS-0,05% Tween20. Posteriormente, las placas fueron incubadas con 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del anticuerpo anti-INF- γ

XMG1.2 conjugado a biotina (Pharmingen, EUA) por 2h a temperatura ambiente. Seguidamente, las placas fueron lavadas 5 veces con PBS-0.05 % Tween 20 e incubadas con un conjugado de streptavidina-peroxidasa a una dilución 1:1000 por 1h. Finalmente, las placas fueron lavadas con PBS-0.05 % Tween 20 y PBS 1X y los spot fueron revelados adicionando 3,3 diaminobenzidina (Sigma, EUA) en tampón Tris-HCl 50 mM; pH 7,4 y 0,3% H₂O₂. Después de 15 min de incubación con el sustrato las placas fueron lavadas con agua corriente, secadas y contados usando un microscopio de disección. Los resultados fueron expresados en número de células secretoras de IFN- γ por 10⁶ esplenocitos luego de sustraer los conteos de los pocillos negativos. Como criterio de positividad se asumió que serían positivas aquellas determinaciones cuyo promedio de las réplicas exceda en dos veces el promedio de los conteos del grupo control negativo y además, la diferencia en el número de conteos promedio debe ser superior en al menos 10 conteos obtenidos mediante lectura directa de las placas.

3.15 Análisis estadísticos

Los resultados de los experimentos de ELISA y ELISPOT fueron procesados utilizando el programa GraphPad Prism, versión 4.00 (GraphPad Software, EUA). Los valores de títulos obtenidos en ELISA así como los conteos de ELISPOT fueron transformados a su logaritmo decimal como método para obtener una distribución normal. A los datos obtenidos se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Levene.

Cuando se detectó normalidad en la distribución de la variable y homocedasticidad, para la comparación de medias entre dos grupos se utilizó la prueba paramétrica t de Student y para las comparaciones múltiples se empleó un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple y como pruebas posteriores, la prueba de Newman-Keuls en caso de que se cumplieran las condiciones de normalidad y homocedasticidad, en caso que no se cumplieran estas condiciones se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. La significación estadística considerada fue del 95 %.

La prueba t de Student se realizó en tres experimentos puntuales que identificamos a continuación:

a) En el esquema B, acápite 3.13.3, para la comparación de los valores de las medias de IgG1 e IgG2a en los grupos inoculados por diferentes rutas mucosales. Para evaluar si

existía superioridad estadística en alguna de las subclases de cada grupo de ratones inmunizados por diferentes rutas de administración, se realizó una prueba t de Student, análisis de dos colas y pareado, en el que se compararon los niveles de IgG1 con sus correspondientes niveles de IgG2a en cada grupo de ratones. Posteriormente, para los grupos donde existieron diferencias significativas se realizó la prueba con el análisis de una cola, con el objetivo de identificar si la superioridad encontrada fue significativa.

b) En el esquema B del acápite 3.13.4 se realizó la comparación de la respuesta anti-HBcAg entre los grupos de ratones inmunizados con este antígeno en PBS por vía IN y con la combinación de este antígeno a la misma dosis y el HBsAg. El análisis estadístico se realizó luego de comprobar que existían las condiciones de normalidad y homocedasticidad en ambos grupos de valores, utilizando la prueba t de Student, análisis no pareado y de dos colas.

c) En el esquema C del acápite 3.13.4 se realizó la comparación de la respuesta anti-HBcAg entre los grupos de ratones inmunizados con cada una de las variantes del HBcAg y el grupo inmunizado con cada variante en combinación con el HBsAg. La comparación de la media del grupo inmunizado con la combinación con el grupo control respectivo en cuanto a respuesta anti HBcAg se realizó luego de comprobar las condiciones de normalidad y homocedasticidad en ambos grupos de valores, utilizando la prueba t de Student, análisis no pareado y de dos colas.

En el resto de los experimentos presentados en este trabajo de tesis se realizó el análisis de múltiples (más de dos) grupos de inmunización a partir de la realización del ANOVA de clasificación simple y como prueba posterior la prueba de Newman-Keuls. No fue necesaria la aplicación de pruebas no paramétricas.

4 RESULTADOS

4.1 Evaluación de la capacidad del HBcAg (variante HBcM492) para formar partículas de naturaleza química nucleoproteica

La pureza de la proteína utilizada en nuestros estudios se verificó antes de comenzar este trabajo por electroforesis en geles de poliacrilamida (Anexo 1A). Adicionalmente, se verificó la identidad de esta proteína mediante ensayo de “western blot” (Anexo 1B).

Con la finalidad de conocer el aspecto físico de esta proteína se examinaron muestras de la proteína utilizando la técnica de microscopía electrónica de transmisión, descrita en el acápite 3.14.7. Durante el estudio de microscopía se visualizaron múltiples campos, en los cuales se pudo comprobar que como resultado del proceso de purificación se obtuvo la proteína HBcM492 como una proteína con un aspecto físico de PSV, de 25 a 30 nm de diámetro (Figura 2A).

El estudio del perfil cromatográfico se realizó de acuerdo a la técnica descrita en el acápite 3.14.8. El análisis de las corridas realizadas por cromatografía de exclusión molecular de alta resolución mostró que la proteína HBcM492 tuvo un perfil caracterizado por un pico máximo, cuyo tiempo de retención fue similar al del HBsAg (Figura 2B).

Se pudo detectar la presencia de material nuclear asociado a la proteína purificada HBcM492 por el incremento en la absorbancia a 260 nm con respecto a otras proteínas como el HBsAg y la seroalbúmina bovina (BSA), las que en igualdad de concentración de proteínas poseen la mitad de la absorbancia a 260 nm comparado con el HBcAg (resultados no mostrados). No obstante, para conocer si el material nuclear estaba asociado a la partícula se realizó una cromatografía en gel de agarosa y en presencia de bromuro de etidio, en la que se pudo demostrar la presencia de material nuclear asociado, presente en la misma zona en que se detecta la proteína. El tratamiento ulterior con RNAsa permitió eliminar la mayor parte del material nuclear asociado a la partícula, evidenciando que el ARN constituye el mayor porcentaje del componente nuclear de esta nucleoproteína (Figura 2C, carriles 2 y 3). En síntesis, estos resultados muestran el aspecto físico de PSV y la naturaleza nucleoproteica de la proteína recombinante HBcM492.

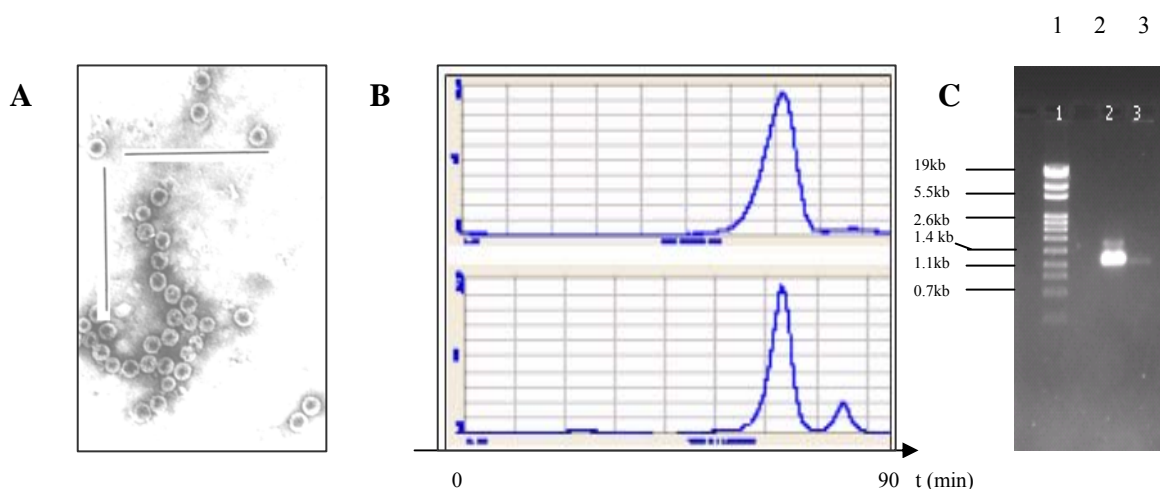


Figura 2. Estudio del aspecto físico, perfil cromatográfico y presencia de ácidos nucleicos asociados al HBcAg (variante HBcM492). **A.** Microscopía electrónica de transmisión, las barras miden 200 nm, **B.** Estudio de la talla y homogeneidad de la partícula por HPLC, en el gráfico superior se muestra el perfil del HBsAg y en el gráfico inferior el del HBcAg. Las corridas se realizaron en columnas TSK-G6000, a un flujo de 0.25 mL/min en PBS, fueron aplicados 100 µg de cada proteína. La detección se realizó a 280 nm. Ambas partículas tuvieron un tiempo de retención de 73 minutos. El segundo pico en el cromatograma inferior se corresponde con un componente no proteico de la solución en que el HBcAg está diluido (EDTA). **C.** Detección de la presencia de ácido nucleico asociado al HBcAg en electroforesis de agarosa. Carril 1. Patrón de pesos moleculares de ADN, 2. HBcAg, 3. HBcAg tratado con RNasa (2 mg/mL) a 37°C durante 6 h. La concentración del HBcAg sometido a tratamiento fue de 0.447 mg/mL

4.2 Estudio de la inmunogenicidad del antígeno recombinante HBcM492

4.2.1 Evaluación de la inmunogenicidad del HBcAg (variante HBcM492) administrado por vía parenteral

La evaluación de la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 se realizó como se describe en el acápite 3.13.3 (Esquema A). Los resultados obtenidos luego de 10 días de la primera inoculación mostraron la alta inmunogenicidad de esta variante del HBcAg, ya que fue posible detectar respuestas de IgG específica anti-HBcAg luego de una sola administración de 40 ng de la proteína (Figura 3A). Es importante destacar que estos niveles de anticuerpos se generaron sin necesidad de utilizar adyuvantes en la preparación administrada.

Luego de la segunda dosis, en la extracción realizada el día 25, se pudo comprobar un fuerte incremento en la respuesta de IgG anti-HBcAg en todos los animales inmunizados, incluyendo el grupo al cual sólo se le administró 8 ng en dos ocasiones (Figura 3B).

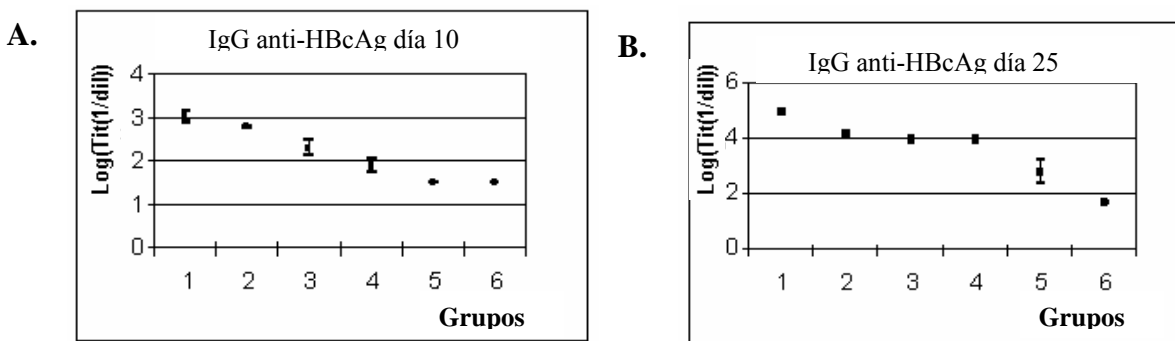


Figura 3. Estudio de la inmunogenicidad del HBcAg (variante HBcM492) en ratones inoculados con niveles de dosis decrecientes por vía IP. **A.** Respuesta de IgG anti HBcAg diez días después de la primera inmunización (día 10). **B.** Respuesta de IgG anti HBcAg, día 25. Los grupos de ratones recibieron: Grupo 1 (G1). 5 µg HBcAg en PBS, G2. 1 µg HBcAg en PBS, G3. 0.2 µg HBcAg en PBS, G4. 0.04 µg HBcAg en PBS, G5. 0.008 µg HBcAg y G6. PBS. En ambas figuras se representan los valores de logaritmo decimal de la media geométrica de los títulos (Log MGT) y de los intervalos de confianza, para una probabilidad del 95 %.

La alta inmunogenicidad de la dosis de 5 µg luego de primera y segunda inoculaciones por vía IN nos permitió diseñar futuros estudios para evaluar la inmunogenicidad de este antígeno cuando se administra por varias rutas de inmunización.

4.2.2 Evaluación de la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 administrada por varias rutas mucosales

Con la finalidad de evaluar la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 cuando ésta es administrada por diferentes rutas mucosales, se desarrolló el estudio descrito en el acápite 3.13.3, (Esquema B). En este estudio la proteína HBcM492 demostró que es capaz de inducir una respuesta de IgG sérica por todas las rutas ensayadas a los 10 días de la primera inmunización. En general, se pudo apreciar que el nivel de la respuesta de anticuerpos de tipo IgG anti-HBcAg en suero fue variable. La ruta IN fue la ruta mucosal por la que se indujo una mayor respuesta anti-HBcAg en suero con respecto al resto de los grupos inmunizados por vías mucosales ($p < 0.05$). La administración de igual dosis de HBcAg por las rutas oral e IVag generaron los menores niveles de títulos de IgG y la administración del HBcAg por las rutas IR y SL resultó en la inducción de niveles de intermedios de IgG anti-HBcAg en suero (Figura 4). El grupo administrado por vía IN generó niveles de respuesta estadísticamente similares a los grupos 1 y 7, en los que se administró el antígeno por las rutas IP y SC, respectivamente.

La dinámica de la respuesta de IgG en suero luego de cada administración por vía IN fue similar a la que desarrollaron los grupos IP y SC (Figura 4), no existiendo diferencias estadísticas entre estos grupos durante todo el ensayo ($p > 0.05$).

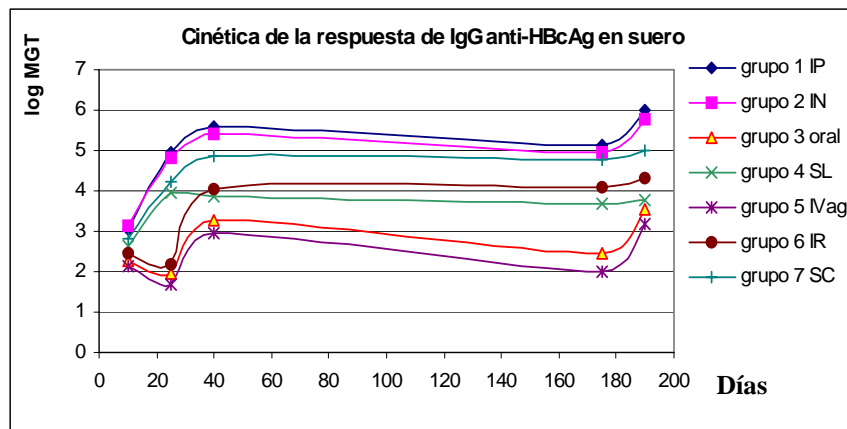


Figura 4. Dinámica de la respuesta de IgG anti-HBcAg (representada por el Log MGT) en ratones inoculados con HBcM492 (5 μ g) por diferentes rutas de administración. Las inoculaciones fueron los días 0, 15, 30 y 180 y las extracciones se realizaron los días 10, 25, 40, 178 y 190. Los sueros de la extracción preinmune y del grupo placebo no resultaron positivos a una dilución 1:10.

El estudio de las subclases de IgG desarrolladas en el suero de todos los grupos inmunizados evidenció que, de modo general, los niveles de IgG1 e IgG2a se encuentran muy balanceados. Sin embargo, se pudo apreciar que el grupo administrado por la ruta IVag generó niveles de IgG1 significativamente superiores a los niveles de IgG2a ($p < 0.05$), contrario a lo ocurrido para el grupo inoculado por vía IN, el que generó una respuesta de IgG2a significativamente superior a la respuesta IgG1 ($p < 0.05$). En el resto de los grupos no existieron diferencias entre ambas subclases (Figura 5).

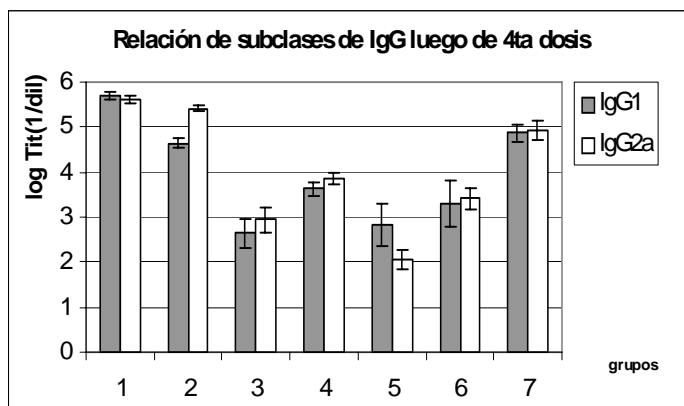


Figura 5. Estudio de la respuesta de subclases de IgG anti HBcAg (variante HBcM492) en ratones inoculados con HBcAg (5 μ g) por diferentes rutas de administración. G1. IP, G2. IN, G3. oral, G4. SL, G5. IVag, G6. IR, G7 SC. En la figura se representan los valores del Log MGT y el intervalo de confianza (95%) luego de la cuarta dosis. Los sueros de la extracción preinmune y los del grupo placebo (G8) no resultaron positivos en estos ensayos a una dilución 1:10.

La respuesta de anticuerpos de tipo IgA se evaluó al finalizar el estudio en muestras de pulmones, en lavados vaginales y en suero de todos los grupos en estudio. El grupo inmunizado por vía IN generó una respuesta de IgA en secreciones vaginales que resultó significativamente superior a la generada por al resto de los grupos en estudio ($p < 0.05$), incluso con respecto a la propia administración IVag (Figura 6A). Un comportamiento similar se evidenció en las muestras de pulmones, resultando significativamente superior la respuesta inducida por el grupo inmunizado por vía IN con el HBcAg con respecto al resto de los grupos (Figura 6B). En el caso de la respuesta de IgA en suero, no existieron diferencias entre los grupos inmunizados.

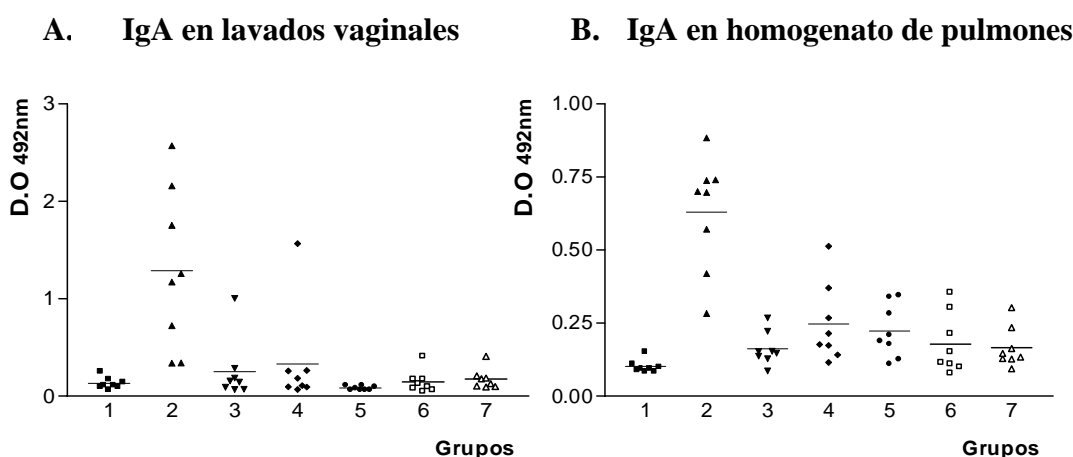


Figura 6. Estudio de la respuesta de IgA anti HBcAg (variante HBcM492) en ratones inoculados con HBcAg (5 µg) por diferentes rutas de administración. G1. IP, G2. IN, G3. oral, G4. SL, G5. IVag, G6. IR, G7 SC. En la figura se muestra la D.O. a 492 nm obtenida por ELISA (dil. 1:10): **A.** Lavados vaginales, **B.** Homogenatos de pulmones.

4.3 Estudio de la inmunogenicidad de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg inoculadas por la vía IN

4.3.1 Comparación de la inmunogenicidad del HBsAg en la formulación combinada, con formulaciones que contienen Acemanano (vía IN) o ALOOH (vía SC)

Teniendo en cuenta la alta inmunogenicidad del HBcAg cuando es administrado por vía IN y la naturaleza nucleoproteica del mismo, se evaluó si se produce algún efecto sobre la inmunogenicidad del HBsAg cuando este antígeno es coadministrado por vía IN con el

HBcAg en ratones. Con esta finalidad se diseñó el estudio de inmunogenicidad que se describe en el acápite 3.13.4 (Esquema A).

Luego de las administraciones los días 0 y 14, se realizó una extracción el día 24 y se evaluó la respuesta de IgG anti-HBsAg en el suero de los ratones. Se pudo apreciar que la respuesta de IgG anti-HBsAg en el grupo 3 fue similar a la respuesta de los grupos 2 y 4, en los que se administró el HBsAg adyuvado con Acemanano por vía nasal y con ALOOH, por vía SC ($p > 0.05$). En este estudio no se pudo detectar respuesta inmune anti-HBsAg luego de dos inoculaciones del HBsAg por vía nasal sin adyuvante (Figura 7). El grupo inmunizado con el HBcAg en PBS (grupo 5) fue utilizado como grupo placebo. Este grupo no generó respuestas anti-HBsAg, descartándose cualquier efecto de incremento de la respuesta por reactividad cruzada. El grupo 6, al que sólo se le administró ALOOH, no produjo respuesta anti-HBsAg a la dilución de 1:100.

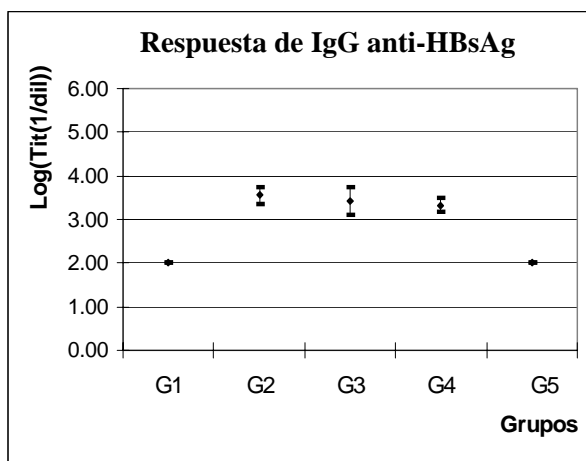


Figura 7. Estudio de la respuesta de IgG anti HBsAg en ratones inoculados con diferentes formulaciones del HBsAg por vía IN. Los grupos en estudio fueron: G1. 10 µg de HBsAg en PBS, vía IN, G2. 10 µg de HBsAg en Acemanano (3 mg/mL), vía IN, G3. 10 µg de HBsAg y 10 µg de HBcAg en PBS, vía IN, G4. 10 µg de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía SC. G5. 10 µg de HBcAg en PBS, vía IN, G6. ALOOH (0.5 mg/mL), vía SC (no mostrado). En la figura se muestran las medias geométricas y los intervalos de confianza (95 %) de los títulos de IgG en el día 24.

4.3.2 Comparación de la inmunogenicidad del HBsAg en la formulación combinada con formulaciones que contienen toxina del cólera (vía IN) o ALOOH (vía IP)

Con el objetivo de comparar el efecto inmunopotenciador generado por la variante HBcM492 sobre la inmunogenicidad del HBsAg con respecto al efecto inducido por la TC por vía IN y por el ALOOH, en este caso por vía IP, se diseñó el estudio de inmunogenicidad que se describe en el acápite 3.13.4 (Esquema B). Este estudio tuvo

como objetivo adicional evaluar la respuesta contra los distintos componentes de naturaleza proteica en las formulaciones empleadas.

La respuesta sérica de anticuerpos anti-HBsAg a los 10 días de la segunda inoculación, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los títulos de IgG anti-HBsAg obtenidos cuando éste antígeno fue inoculado junto a la TC, el HBcAg o el acemanano (grupos 5, 6 y 7, respectivamente). Este efecto potenciador fue significativo cuando se compararon los niveles de anticuerpos anti-HBsAg obtenidos para los grupos 5, 6 y 7 con el obtenido para el grupo control 8 ($p < 0.05$), en el que se inoculó al HBsAg en PBS por vía IN. (Figura 8A).

En el caso del grupo 9 en el que el HBsAg se inoculó adyuvado en ALOOH por vía IP, se obtuvieron títulos significativamente inferiores a los obtenidos para los grupos 5, 6 y 7 (Figura 8A).

Los grupos inmunizados con las dosis de 1 y 5 μg de HBcAg por vía nasal (grupos 3 y 4) generaron una respuesta de IgG anti-HBcAg a nivel sérico, detectable desde la primera administración (día 10), reproduciendo los resultados obtenidos anteriormente. En el caso de la TC, sólo se encontró la seroconversión del grupo de 5 μg con niveles de IgG en sueros significativamente inferiores a los obtenidos por el HBcAg ($p < 0.05$, resultado no mostrado).

También se estudió el efecto del HBsAg sobre la inmunogenicidad de los antígenos HBcAg y TC, coadministrados por vía IN en los grupos 5 y 6 (Figura 8B y C). Se generó una respuesta de IgG anti-HBcAg superior, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), en el grupo de la formulación combinada (grupo 5) con respecto al grupo inmunizado con igual cantidad del HBcAg en PBS (grupo 4). Sin embargo, la respuesta de IgG anti-TC en suero no difirió significativamente entre el grupo inoculado con la mezcla de la toxina con el HBsAg (grupo 6) y su control, en el que sólo se administró la TC (grupo 1).

Es importante destacar que la inoculación de la TC en los ratones presentó signos evidentes de reactogenicidad. En los reportes de estos estudios provenientes del Bioterio del CIGB se registró que la administración de la dosis de 5 μg de la TC generó erizamiento del pelo en todos los animales inmunizados con posterioridad a la administración de esta toxina / adyuvante. Este efecto fue mucho menor en los animales

inmunizados con 1 μg de TC y no se observó en ninguna de las dosis administradas de HBcAg o de HBsAg, tanto en este estudio como en estudios anteriores o posteriores. Por el conocimiento de este efecto y la experiencia previa (109) con la dosis de 1 μg de TC, esta última fue la dosis empleada con el HBsAg en el presente estudio.

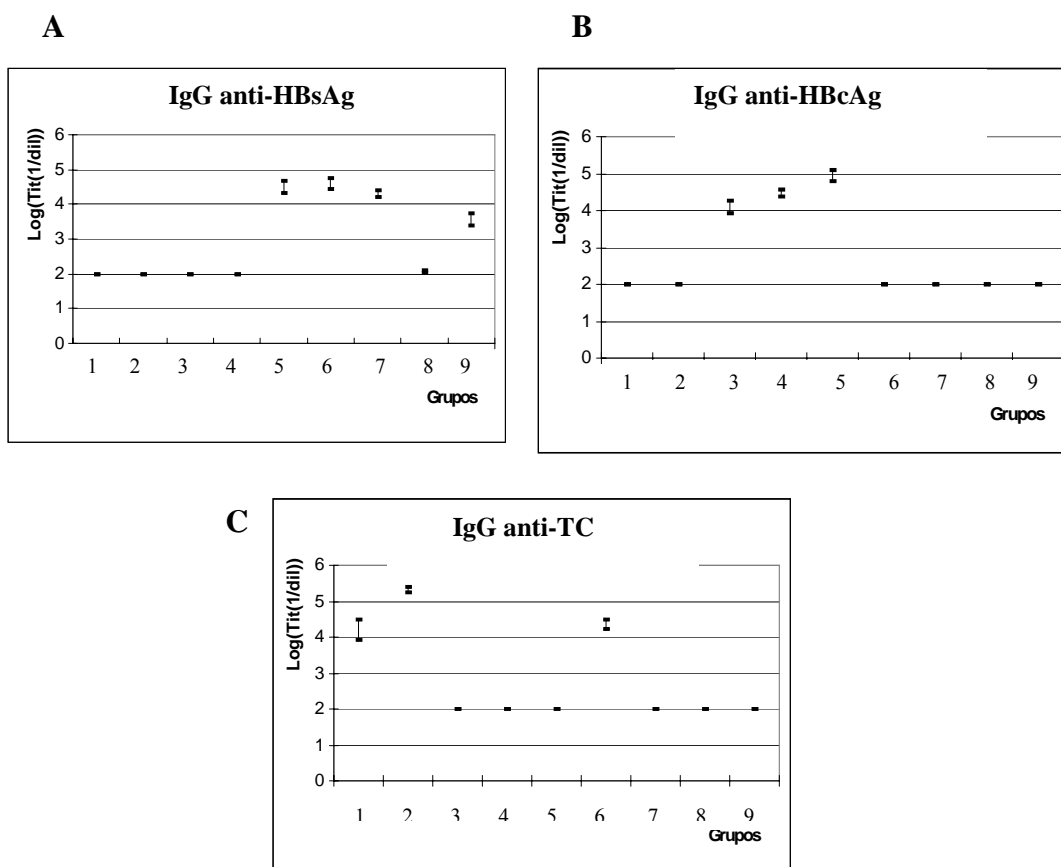


Figura 8. Se representa el Log MGT de IgG anti-HBsAg (A), HBcAg (B) y TC (C) en suero y el intervalo de confianza (95 %). Todos los grupos excepto el grupo 9, fueron inmunizados por vía IN. G1. 1 μg de TC, G2. 5 μg de TC, G3. 1 μg de HBcAg, G4. 5 μg de HBcAg, G5. 5 μg de HBcAg y 5 μg de HBsAg, G6. 5 μg de HBsAg y 1 μg de TC, G7. 5 μg de HBsAg y Acemanano (3 mg/mL), G8. 5 μg de HBsAg en PBS, G9. 5 μg de HBsAg en ALOOH (0,5 mg/mL), por vía IP.

4.3.3 Inmunogenicidad por vía IN de dos variantes del HBcAg y estudio de la respuesta inmune de las formulaciones combinadas con el HBsAg.

El estudio de la respuesta inmune humoral inducida por dos variantes diferentes del HBcAg obtenidas en el CIGB, así como la evaluación del efecto de la coadministración de ambas variantes sobre la respuesta inmune anti-HBsAg fue el objetivo del estudio de inmunogenicidad descrito en el acápite 3.13.4 (Esquema C). En este experimento se

administraron las dos variantes del HBcAg (HBcM492 y HBcRIV-2), así como sus respectivas combinaciones con el HBsAg. Se utilizó la proporción HBcAg:HBsAg de 2:1 con 10 y 5 µg de antígeno por ratón, respectivamente.

La evaluación de la respuesta de IgG anti-HBsAg en el suero de los ratones inoculados por vía IN con las formulaciones combinadas (grupos 3 y 4), mostró un incremento significativo en los títulos ($p < 0.05$) con respecto al grupo inmunizado con el HBsAg en PBS (grupo 5), en ambas preparaciones del HBcAg (Figura 9). La respuesta inmune generada por los grupos inoculados con la formulación combinada por vía IN también resultó superior a la generada en el grupo 6, en el que se administró el HBsAg adsorbido en ALOOH por vía SC. No existieron diferencias en los niveles de IgG anti-HBsAg inducidos por ambas formulaciones combinadas.

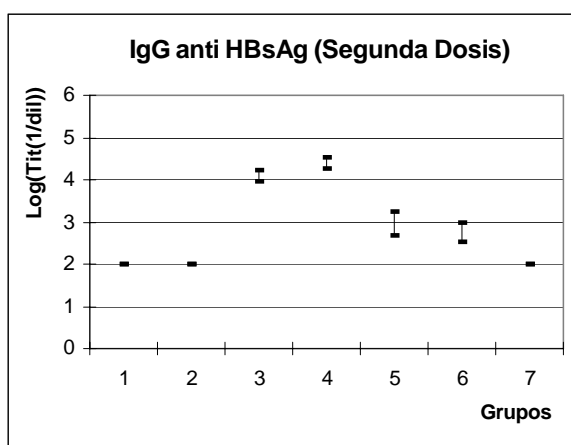


Figura 9. Respuesta de IgG en suero contra el HBsAg. Se ensayaron las siguientes variantes: G1. 10 µg de HBcRIV-2, G2. 10 µg de HBcM492, G3. 10 µg de HBcRIV-2 / 5 µg de HBsAg, G4. 10 µg de HBcM492 / 5 µg de HBsAg, G5. 5 µg de HBsAg, G6. 5 µg de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía SC, G7. PBS. Excepto el grupo 6, todos los grupos fueron inmunizados por vía IN. En la figura se muestran los valores del Log MGT y del intervalo de confianza para una probabilidad del 95 %.

El ELISA para la detección de respuesta anti-HBcAg se realizó recubriendo las placas con ambas variantes del HBcAg. La respuesta de IgG anti-HBcAg en suero de ratones inoculados por vía IN con las dos variantes de este antígeno resultó detectable desde el día 10, reproduciendo resultados anteriores. Adicionalmente, se pudo apreciar un incremento significativo ($p < 0,05$) de la respuesta de IgG anti-HBcAg para ambas variantes en las formulaciones combinadas (grupos 3 y 4), respecto a los grupos 1 y 2, inoculados con las variantes de HBcAg correspondientes (resultados no mostrados). Este incremento fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$) después de primera y segunda dosis para ambas variantes del HBcAg. Como se aprecia, los resultados fueron similares (Figuras 10 A y B).

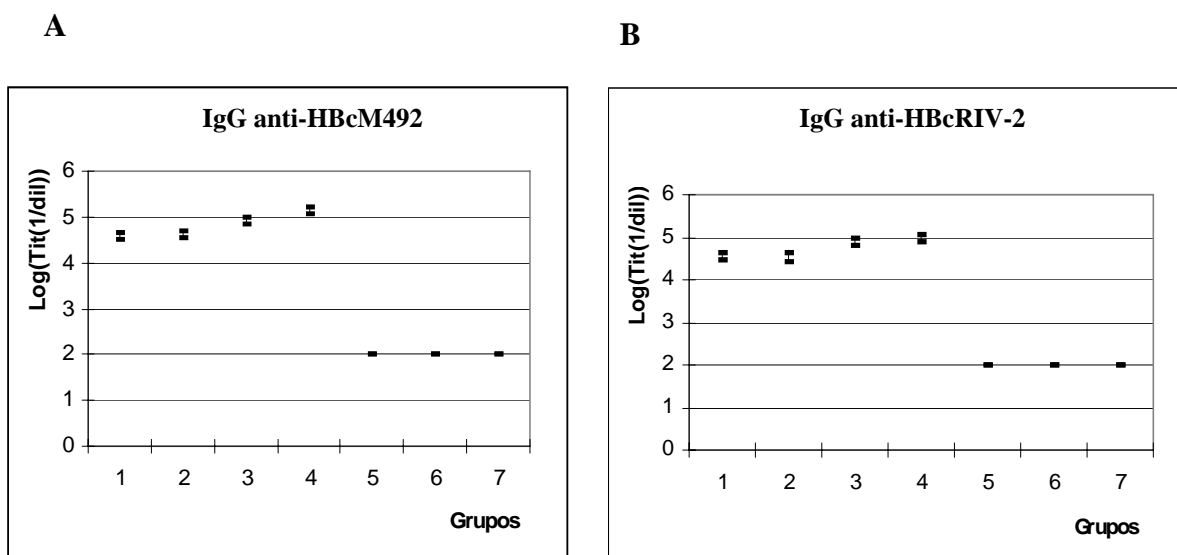


Figura 10. Respuesta de IgG en suero contra el HBcAg, **(A)** variante HBcM492 y **(B)** variante HBcRIV-2. Se ensayaron las siguientes variantes: G1. 10 μ g de HBcRIV-2, G2. 10 μ g de HBcM492, G3. 10 μ g de HBcRIV-2 / 5 μ g de HBsAg, G4. 10 μ g de HBcM492 / 5 μ g de HBsAg, G5. 5 μ g de HBsAg, G6. 5 μ g de HBsAg en ALOOH (0.5 mg/mL), vía SC, G7. PBS. Excepto el grupo 6, todos los grupos fueron inmunizados por vía IN. En la figura se muestran los valores del Log MGT y del intervalo de confianza para una probabilidad del 95 %.

4.3.4 Estudio del patrón de reconocimiento de secuencias lineales del HBcAg de sueros y secreciones de ratones y de los sueros de humanos infectados.

El uso de la tecnología del mapeo epitópico de proteínas sobre membranas de celulosa permitió obtener un mayor nivel de caracterización de la respuesta inmune humoral generada por la administración del HBcAg. Uno de los objetivos de este experimento fue conocer si el reconocimiento epitópico de los sueros de ratones inmunizados con la proteína HBcM492 coincide, desde el punto de vista cualitativo, con la respuesta que genera el HBcAg natural en humanos infectados por el VHB, lo cual sería una evidencia del correcto ensamblaje de la partícula recombinante. Esta tecnología también fue utilizada para evaluar el reconocimiento de las secuencias lineales expuestas en la superficie de la partícula del HBcAg por parte de los anticuerpos del suero de ratones inoculados por vía IN o SC con el HBcAg. Adicionalmente, se evaluó el reconocimiento de los anticuerpos de tipo IgA presentes en los lavados vaginales de ratones inmunizados por vía nasal. Por último, se comparó el reconocimiento de los anticuerpos séricos de tipo IgG generados por la administración de las dos variantes del HBcAg utilizadas en este estudio.

Para conocer si los sueros de ratones inmunizados con las variantes recombinantes del HBcAg presentaban un patrón de reconocimiento similar al de la respuesta en humanos, se ensayaron sueros humanos anti-HBcAg positivos procedentes de Bancos de Sangre. El resultado, mostrado en el Anexo 2, evidenció un patrón de reconocimiento similar para los anticuerpos generados naturalmente (S4) y aquellos obtenidos mediante la administración de ambas variantes recombinantes (S1 y S2). Sin embargo, en el caso del reconocimiento de los sueros de personas infectadas, el reconocimiento del péptido 30 fue mucho menor. De esta comparación también se pudo evidenciar el reconocimiento distintivo del péptido 13 en el grupo inoculado por vía SC (S3), respecto al resto de los grupos.

De modo general, los sueros y lavados vaginales positivos analizados poseen un patrón de reconocimiento que se repite; encontrándose una respuesta positiva para los péptidos: 7, 8, 10, 11, 17, 18, 30 y 31. Es de destacar que el reconocimiento observado para los dos últimos péptidos es particularmente intenso en los sueros murinos analizados. Con el objetivo de simplificar el análisis del experimento, se esquematizó este resultado de dos formas, la intensidad del reconocimiento fue representada con líneas de mayor o menor grosor sobre la secuencia de aa de la proteína (Figura 11). Por otra parte, se muestra el resultado del reconocimiento visual de los péptidos, aquellos que fueron reconocidos con mayor intensidad tuvieron un número mayor de signos (+) (Figura 12).

MDIDPYKEFGATVELLSFLPSDFFPSVRDLLDTASALYREALESPEHCSPHHTALRQAILCWGELM

TLATWVGNNLEDPASRDLVVNYVNTNVGLKIRQLLWFHISCLTFGRETVLEYLVSFVWIRTTPG

_____

YRPPNAPILSTLPETTIVRRRGRSPRRRTSPRRRRSQSPRRRRSQSRESQCKLGSVDLN

Figura 11. Secuencia de aa del HBcAg incluyendo los últimos 8 aa de la variante HBcRIV-2. Las líneas señalan los péptidos reconocidos de manera general por los sueros y lavados vaginales de ratones inmunizados con el HBcAg, en sus distintas formulaciones y variantes, durante el mapeo en membrana de celulosa. La intensidad de cada línea se corresponde con la intensidad promedio del reconocimiento del péptido en cuestión. Con línea de puntos se señala un péptido que sólo es reconocido cuando el HBcAg es administrado por vía parenteral en ALOOH.

Péptidos	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	LV1	LV2
1- MDIDPYKEFGAT	-	-	-	-	-	-	-	+	-
2- KEFGATVELLSF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3- VELLSFLPSDFF	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4- LPSDFFPSVRDL	-	-	-	-	+	-	-	-	-
5- PSVRDLLDTASA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6- LDTASALYREAL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7- LYREALESPEHC	++++	+++	+++	+	+	-	-	++	-
8- ESPEHCSPHHTA	++	+++	++	+	+	-	-	+	-
9- SPHHTALRQAIL	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10- LRQAILCWGELM	++++	+++	+++	+++	+++	*	*	+++	*
11- CWGELMLATWV	+	+	+	+	++	-	-	+	-
12- TLATWVGNNLED	-	+	+	-	+	-	-	+	-
13- GNNLEDPASRDL	-	-	++	-	-	-	-	-	-
14- PASRDLVVNYVN	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15- VVNYVNTNVGLK	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16- TNVGLKIRQLLW	-	-	-	+	+	-	-	+	-
17- IRQLLWFHISCL	++	++	++	+++	+++	*	*	+++	*
18- FHISCLTFGRET	+++	+++	+++	++	++	-	-	++	-
19- TFGRETVLEYLV	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20- VLEYLVSFGVWI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21- SFGVWIRTPPGY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22- RTPPGYRPPNAP	-	-	-	+	+	-	-	+	-
23- RPPNAPILSTLP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24- ILSTLPETTIVR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25- ETTVVRRRGRSP	-	-	-	+	+	-	-	-	-
26- RRRGRSPRRRTPS	-	-	-	+	+	-	-	-	-
27- RRRTPSPRRRRS	-	-	-	+	+	-	-	-	-
28- PRRRRSQSPRRR	-	-	-	+	+	-	-	-	-
29- QSPRRRRSQSRE	-	-	-	+	+	-	-	-	-
30- RSQSRESQCKLG	+++	++++	++++	++	++++	-	-	++	-
31- SQCKLGSVDLN	++	++++	+++	+	++++	-	-	++	-

Figura 12. Reconocimiento de los péptidos sobrelapados que cubren la secuencia del HBcAg (variante HBcRIV-2) por sueros y lavados vaginales de ratones inmunizados con este antígeno o sus formulaciones combinadas y por suero de humanos infectados por el VHB. Se pudieron distinguir en cada membrana hasta 4 niveles de intensidad de reconocimiento, representados con 1 a 4 signos (+) por péptido en dependencia de la intensidad. Todos los sueros fueron ensayados a la dilución 1:100 y los lavados vaginales a la dilución 1:10. Las muestras se obtuvieron después de 3 inoculaciones cada 14 días. Los sueros (**S**) ensayados se correspondieron con ratones inmunizados con 5 µg de: **S1**. HBcRIV-2 vía IN, **S2**. HBcM492 vía IN, **S3**. HBcRIV-2 en ALOOH vía SC, **S5**. HBcRIV-2 y HBsAg vía IN, **S6**. HBsAg vía IN (reactividad negativa anti HBcAg). Los sueros humanos empleados fueron: **S4**. Mezcla de sueros humanos con reactividad positiva anti-HBcAg y **S7**. Mezcla de sueros humanos con reactividad negativa al HBcAg. Los lavados vaginales (**LV**) ensayados fueron obtenidos en ratones inmunizados con: **LV1**. HBcM492 y HBsAg por vía IN, **LV2**. HBsAg vía IN (Lavados con reactividad negativa anti-HBcAg). El símbolo (*) se corresponde con la aparición de un color amarillo, diferente a la coloración azul positiva.

En el caso de los sueros y lavados vaginales negativos analizados (Anexo 2, Figuras S6, S7 y LV2), no se observó reacción positiva, sin embargo se observó una coloración amarilla para los péptidos 10 y 17, la cual no se corresponde con la coloración azul que se obtiene para los reconocimientos positivos. Esta coloración ocurrió por reacciones inespecíficas y resulta imposible de eliminar con la regeneración de la membrana.

Nuestros resultados sugieren que ambas variantes del HBcAg poseen una estructura antigénica similar -y cercana a la estructura nativa. Nos basamos, primeramente, en la similitud en la intensidad de reconocimiento cuando se cruzan los sueros obtenidos con cada variante en ensayos de ELISA que utilizan como recubrimiento una u otra variante de este antígeno (Figuras 10A y B). En segundo lugar, porque los sueros obtenidos mediante la inoculación de ambas variantes por vía IN en ratones poseen un patrón de reconocimiento de secuencias lineales muy semejante entre sí y con respecto al patrón generado por los sueros de personas infectadas con el VHB (Figura 12). Estos elementos se adicionan al reconocimiento de la proteína HBcM492 por sueros de pacientes.

4.3.5 Efecto de la dosis del HBcAg en la inmunogenicidad del HBsAg y duración de la respuesta inmune contra ambos antígenos por vía IN

El HBcAg evidenció tener efecto potenciador sobre la respuesta inmune del HBsAg cuando ambos antígenos fueron coadministrados por la vía IN. En estos experimentos el HBcAg fue utilizado a dosis similares o dos veces por encima, indistintamente, entre 5 y 10 μg para ambos antígenos.

Con la finalidad de conocer si el incremento de la dosis del HBcAg implicaba un incremento en la inmunogenicidad del HBsAg, se decidió realizar el estudio de inmunogenicidad que se describe en el acápite 3.13.4 (Esquema D). En este estudio se evaluaron 3 niveles de dosis del HBcAg en proporciones de 1:1; 1:2 y 1:4 para el HBsAg y para el HBcAg, respectivamente. La dosis empleada de HBsAg fue de 5 μg . Este estudio de inmunogenicidad fue seguido durante 270 días con el objetivo de conocer la dinámica de la respuesta de IgG en suero a partir de la administración nasal de estas formulaciones con cantidades crecientes de HBcAg de 5, 10 y 20 μg , respectivamente.

Después de la segunda dosis, la respuesta de IgG anti-HBsAg en suero para los tres grupos inmunizados con la formulación combinada (grupos 2, 3 y 4) fue superior, con significación estadística, respecto a la que se obtuvo en el grupo inoculado por vía IN con

igual cantidad de HBsAg en PBS ($p < 0,01$) y similar a la alcanzada por el grupo en que se inoculó al HBsAg en acemanano por vía IN (grupo 5). La administración IM del HBsAg en ALOOH (grupo 6) generó niveles estadísticamente similares a los obtenidos por todos los grupos inoculados por vía IN (Figura 13 A). Sin embargo, el grupo inmunizado con la dosis de 20 μg de HBcAg (grupo 4) generó la menor respuesta de anticuerpos en el suero de los ratones inoculados, respuesta que fue significativamente inferior a la que se generó por la dosis de 10 μg de HBcAg (grupo 3).

El análisis de la respuesta de IgG anti-HBsAg el día 270 aún evidenció el efecto potenciador del HBcAg sobre la respuesta inmune anti-HBsAg, al existir una diferencia muy significativa ($p < 0,01$) en los niveles de respuesta de los grupos inmunizados por vía IN con las formulaciones combinadas respecto al grupo 1, inoculado con HBsAg en PBS (Figura 13 B). Además, se pudo verificar una lenta caída de la respuesta inmune en los sueros de los ratones inmunizados con las formulaciones combinadas, tanto para los títulos anti-HBsAg como en el caso de los títulos anti-HBcAg (Figuras 13 C, D y E).

Otro aspecto de interés en este estudio fue la evaluación de la respuesta inmune mucosal contra ambos antígenos del VHB, obtenida a partir de la inoculación de las diferentes formulaciones empleadas en el estudio, luego de la tercera inoculación (día 40). Este estudio permitió demostrar la presencia de una respuesta de IgA anti-HBsAg en los lavados vaginales de todos los animales inmunizados por la ruta nasal con el HBsAg, resultando imperceptible la respuesta inducida por la formulación parenteral. Esta respuesta resultó significativamente superior en los grupos inmunizados con las formulaciones combinadas (grupos 2-4), con respecto al grupo 1, en el que se administró al HBsAg en PBS (Figura 14A) y resultó similar a la obtenida con el HBsAg inoculado con el Acemanano (grupo 5).

Con respecto a la respuesta anti-HBcAg, se pudo comprobar un incremento significativo de la respuesta de IgA en secreciones vaginales en aquellos grupos inoculados con 10 y 20 μg de HBcAg (grupos 3 y 4) con respecto al grupo 2, el que recibió 5 μg de este antígeno, todos estos grupos recibieron al HBcAg en formulaciones combinadas (Figura 14B).

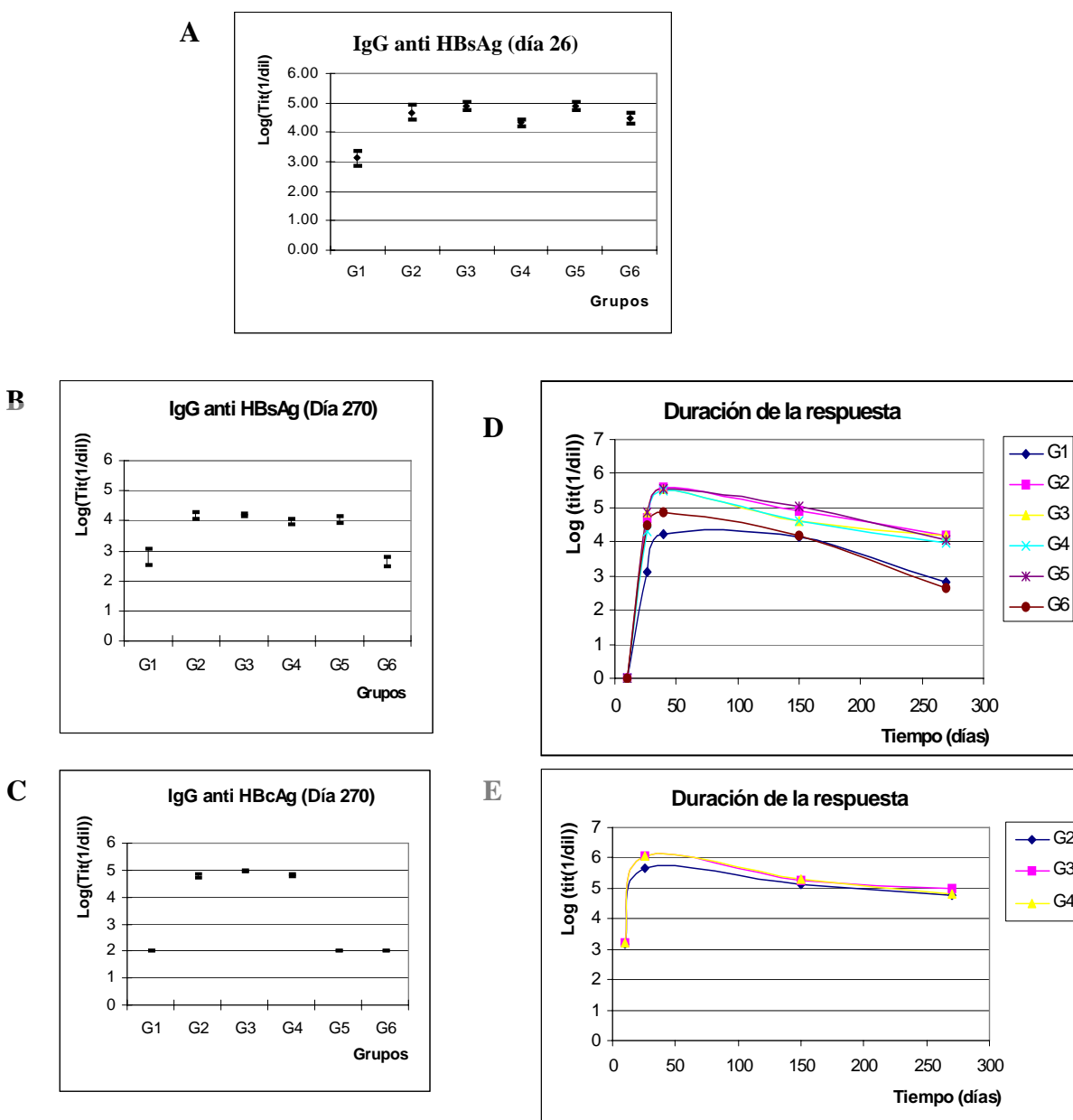


Figura 13. Efecto del incremento de la dosis del HBcAg en la respuesta inmune de la formulación combinada. **A.** Respuesta de IgG anti-HBsAg en suero, extracción realizada el día 26 (luego de la 2^{da} dosis). **B.** Respuesta anti-HBsAg el día 270, **C.** Respuesta anti-HBcAg el día 270, **D.** Dinámica de la respuesta anti-HBsAg, **E.** Dinámica de la respuesta anti-HBcAg. Las variantes ensayadas fueron: G1. HBsAg 5 μ g, G2. HBsAg 5 μ g / 5 μ g de HBcAg, G3. HBsAg 5 μ g y 10 μ g de HBcAg, G4. HBsAg 5 μ g y 20 μ g de HBcAg, G5. HBsAg 5 μ g y Acemanano 3 mg/mL (m:v), G6. HBsAg 5 μ g en ALOOH (0.5mg/mL) vía IM. Los grupos 1-5 fueron inmunizados por vía IN. En las figuras se muestran los valores de Log MGT y el intervalo de confianza para una probabilidad del 95%. En los gráficos D y E sólo se muestran los valores de Log MGT. La respuesta de IgG anti-HBsAg es indetectable a los 10 días de iniciado el estudio, consistente con su carácter T-dependiente.

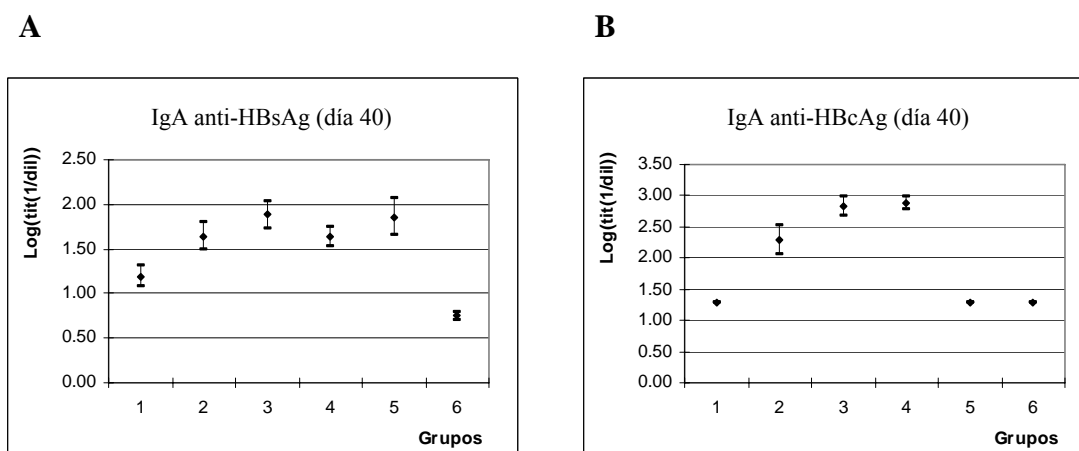


Figura 14. Evaluación de la respuesta de IgA específica para los antígenos HBsAg y HBcAg en lavados vaginales. Los lavados vaginales se realizaron el día 40. **A.** Respuesta de IgA anti-HBsAg, **B.** Respuesta de IgA anti-HBcAg. Las variantes ensayadas fueron: G1. HBsAg 5 μ g, G2. HBsAg 5 μ g / 5 μ g de HBcAg, G3. HBsAg 5 μ g y 10 μ g de HBcAg, G4. HBsAg 5 μ g y 20 μ g de HBcAg, G5. HBsAg 5 μ g y Acemanano 3 mg/mL (m:v), G6. HBsAg 5 μ g en ALOOH (0.5mg/mL) vía IM. Los grupos 1-5 fueron inmunizados por vía IN. Las figuras muestran los valores de Log MGT y los intervalos de confianza para una probabilidad de un 95 %.

4.4 Caracterización de la respuesta inmune inducida por la administración nasal de la formulación combinada de los antígenos del VHB

4.4.1 Estudio de la respuesta de subclases de IgG en suero

Con el objetivo de profundizar en las características de la respuesta inmune inducida por la formulación nasal que contiene a los antígenos del VHB, se llevó a cabo el estudio de inmunogenicidad que se describe en el acápite 3.13.4 (Esquema E). Un esquema similar se desarrolló en ratones C57/B16 con el objetivo de conocer las características de la respuesta inmune en otra línea de ratones.

La respuesta de IgG en suero de los ratones inmunizados con las formulaciones descritas reprodujo las características mencionadas con anterioridad para las comparaciones entre estos grupos, verificándose un incremento en la respuesta tanto de anti-HBsAg como de anti-HBcAg, producto de la combinación de ambos antígenos (datos no mostrados).

Para profundizar en el estudio del patrón de subclases de IgG, se estudió el comportamiento de las subclases de IgG en ratones Balb/c y C57/B16 inmunizados con la formulación combinada nasal, con el HBsAg en PBS por vía IN y con la formulación del HBsAg en ALOOH.

El análisis del comportamiento de estas subclases de IgG anti-HBsAg mostró una reducción altamente significativa ($p < 0.001$) en las razones IgG1: IgG2a e IgG1: IgG2b en

el grupo inmunizado con la formulación IN combinada con respecto al grupo control inoculado por vía intramuscular con el HBsAg en ALOOH. En la Figura 15, se muestran los niveles de títulos de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b para cada ratón de los grupos inmunizados por vía IN con la combinación HBsAg:HBcAg (Figura 15A), con el HBsAg en PBS (Figura 15B) y además con el HBsAg en ALOOH por vía IM (Figura 15C). Un comportamiento similar en el patrón de subclases se verificó en la línea C57/B16.

Respecto a la respuesta de subclases de IgG anti-HBcAg, se pudo verificar una potente respuesta de IgG2a, superior a la respuesta de IgG1, aspecto que no fue modificado por la combinación con el HBsAg. Es decir, el mismo patrón que se obtiene con la inmunización del HBcAg sólo por vía IN.

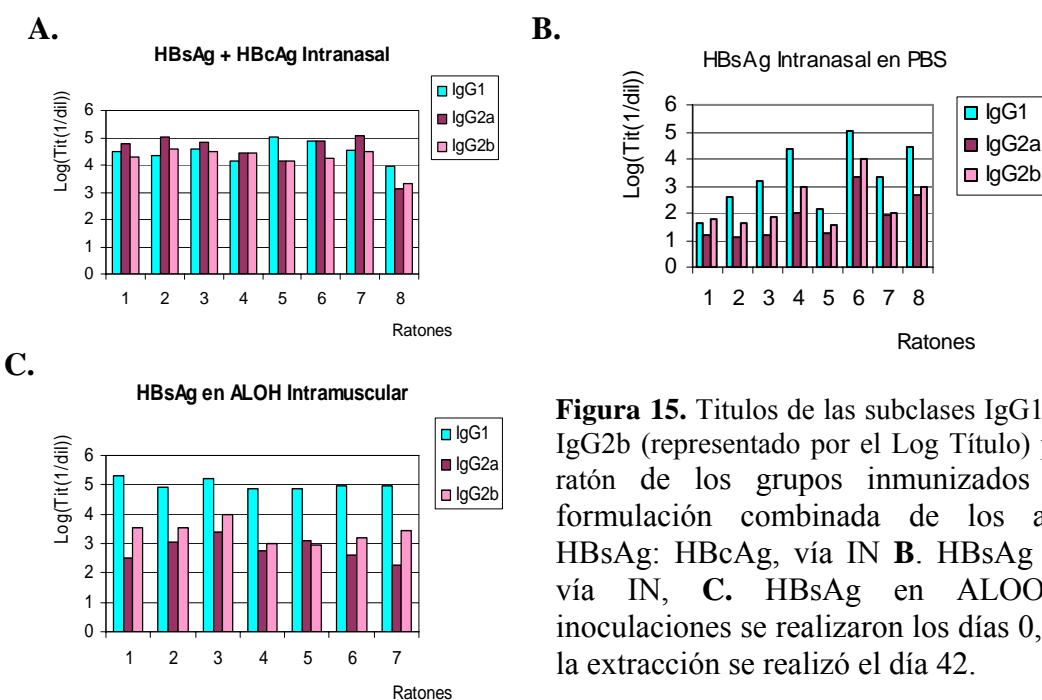


Figura 15. Títulos de las subclases IgG1, IgG2a e IgG2b (representado por el Log Título) para cada ratón de los grupos inmunizados con **A.** formulación combinada de los antígenos HBsAg: HBcAg, vía IN **B.** HBsAg en PBS, vía IN, **C.** HBsAg en ALOOH. Las inoculaciones se realizaron los días 0, 14, 28 y la extracción se realizó el día 42.

4.4.2 Evaluación de la respuesta celular inducida por la formulación combinada de los antígenos del VHB.

En el presente estudio se evaluó la capacidad de las formulaciones combinadas administradas por la vía IN para inducir respuestas inmunes mediadas por células de bazo de los ratones inmunizados. Con tal finalidad, se evaluó la respuesta linfoproliferativa de las células del bazo de animales inmunizados.

Como resultado de este estudio, se demostró la existencia de una respuesta linfoproliferativa positiva producto de la administración de formulaciones nasales que contienen el HBsAg, el HBcAg o su formulación combinada. Se evidenció, además, un fuerte incremento producto de la administración de la formulación combinada con respecto a la respuesta generada por los grupos inmunizados con las formulaciones nasales monovalentes (Figuras 16A y B). Es importante destacar que el incremento de la respuesta linfoproliferativa se observó tanto en el caso de la estimulación con el HBsAg como con el HBcAg. Cada antígeno potenció la inmunogenicidad celular del otro antígeno presente en la formulación combinada.

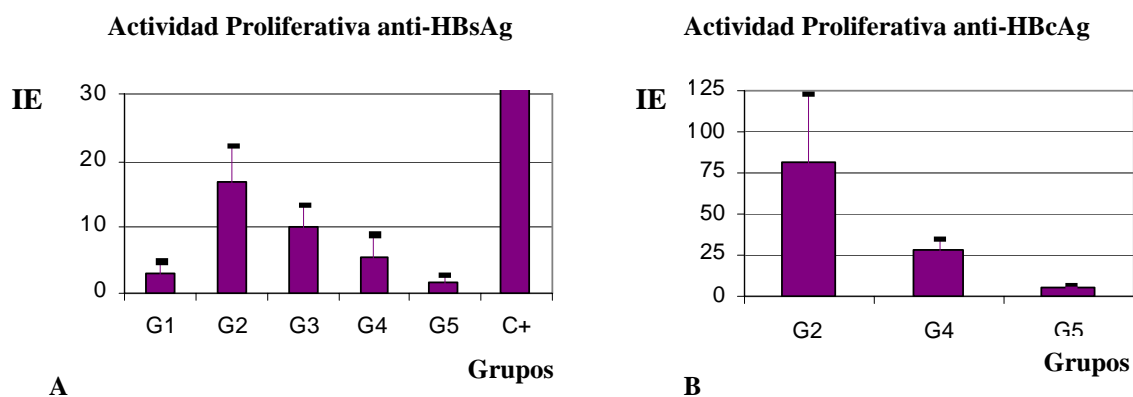


Figura 16. Actividad proliferativa a partir de la reestimulación de células de bazo estimuladas con: **A:** HBsAg 1 μ g y **B:** HBcAg 0.1 μ g. Los ratones fueron inmunizados con: G1. 5 μ g HBsAg en ALOOH, G2. 5 μ g HBsAg y 5 μ g HBcAg vía IN, G3. 5 μ g HBsAg, G4. 5 μ g HBcAg, G5. PBS IN. Las inoculaciones fueron los días 0, 14 y 28 y los bazos se extrajeron el día 42. Como control positivo se emplearon células estimuladas con Con A por cada grupo de ensayo.

La administración intramuscular del HBsAg en ALOOH indujo un bajo nivel de actividad proliferativa con respecto al obtenido con la formulación nasal monovalente, y aun mucho menor al obtenido con la formulación combinada (Figura 16A, G1). No obstante a que los estudios de la actividad linfoproliferativa son experimentos que se realizan estimulando una mezcla de las células del bazo de 3 ratones por grupo de inmunización, los resultados mostrados se reprodujeron en al menos 3 ocasiones, e incluso se pudo observar un comportamiento similar a los 30 días de la última inoculación del antígeno (datos no mostrados). El resultado de los estudios de actividad proliferativa fue consistente con los resultados alcanzados en el estudio de la respuesta inmune humoral contra ambos antígenos.

Como parte de la caracterización de la respuesta celular, se estudió la capacidad de la formulación nasal de potenciar la secreción de IFN- γ , a partir de la re-estimulación *in vitro* de células de bazo de ratones inmunizados, mediante un ensayo de ELISPOT que utilizó al péptido S₍₂₈₋₃₉₎, del HBsAg, reconocido por células CD8⁺, y de naturaleza inmunodominante en ratones Balb/c. A diferencia de la determinación de la actividad linfoproliferativa, la determinación de la frecuencia de células secretoras de IFN- γ por ELISPOT se realizó a partir de la estimulación de células de ratones individuales. Como resultado de este estudio, también se pudo apreciar una respuesta positiva para todos los grupos presentes en el estudio e inmunizados con formulaciones simples o combinadas del HBsAg. La formulación combinada generó los mayores niveles de frecuencias de células secretoras de IFN- γ en respuesta al estímulo con el péptido. Esta respuesta resultó estadísticamente superior a la obtenida con el grupo control inmunizado por la vía IN sin HBcAg ($p < 0.05$), así como respecto al control parenteral, en el que los ratones fueron inmunizados con el HBsAg en ALOOH por vía IM ($p < 0.05$). En el caso que se representa, la determinación fue realizada 1 mes posterior a la dosis de refuerzo (Figura 17). La reestimulación de células del grupo inmunizado con el HBcAg y del grupo control negativo no generó células viables.

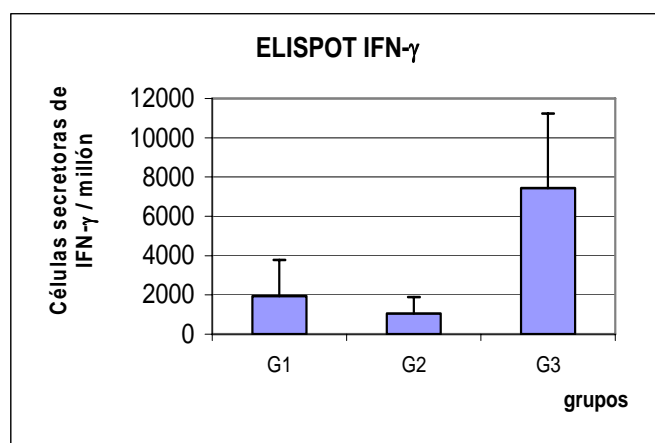


Figura 17. Ensayo de ELISPOT realizado 1 mes posterior a la dosis de refuerzo (día 120). Los esplenocitos fueron cultivados *in vitro* con el péptido S₍₂₈₋₃₉₎ del HBsAg y se detectaron las células secretoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISPOT individualizado ($n=5$). G1. HBsAg en ALOOH, vía IM, G2. HBsAg en PBS, vía IN y G3. HBsAg:HBcAg, vía IN. Inoculaciones 0, 14, 28, los bazos se extrajeron al mes de la última dosis.

4.5 Estudio de la formulación combinada por técnicas de ME y cromatografía de exclusión molecular de alta resolución.

4.5.1 Estudio de la formulación combinada por ME de transmisión

La formulación combinada del HBsAg y el HBcAg en PBS fue caracterizada mediante ME de transmisión con el objetivo de conocer las características morfológicas de los antígenos en la mezcla.

Inicialmente, las partículas del HBcAg habían sido estudiadas como parte de la caracterización de la variante HBcM492, purificado para este trabajo. Este antígeno mostró una apariencia física de partículas semejante a virus, como se observa en la Figura 18A. El tamaño del HBsAg, resultó inferior en algunos nanómetros al del HBcAg (Figura 18B). Ambos antígenos tuvieron un rango de tallas entre los 20 y los 30 nm de diámetro.

A partir del análisis visual de la imagen del HBsAg y del HBcAg fue posible diferenciar ambos antígenos, tomando como punto de comparación el centro de la partícula del HBcAg (Figura 18A), el cual muestra una coloración oscura o zona de mayor densidad electrónica, lo cual no se observa en la preparación del HBsAg (Figuras 18B). Este hecho permitió distinguir ambas partículas en los estudios de ME de la formulación combinada (Figura 18C). De este modo, fue posible observar con facilidad la agregación espontánea de ambas partículas en la formulación utilizada en los estudios inmunológicos. Es bueno destacar que esta agregación espontánea también fue observada en los antígenos por separado, como se observa en las Figuras 18 A y B.

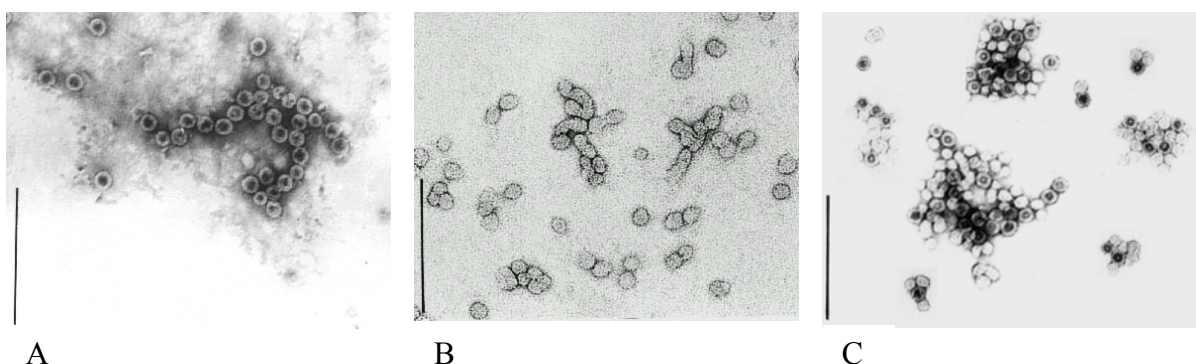


Figura 18. Estudio por ME de transmisión de los antígenos HBsAg, HBcAg y de la combinación de ambos antígenos en PBS. **A.** HBsAg (0,1 mg/mL), **B.** HBcAg (0,1 mg/mL), **C.** HBsAg: HBcAg (0,1 mg/mL de cada antígeno). Las barras miden 200 nm.

4.5.2 Estudio del perfil cromatográfico de la formulación combinada mediante técnica de cromatografía de exclusión molecular de alta presión.

Teniendo en cuenta que las partículas de HBsAg y de HBcAg poseen una tendencia a la agregación, y que tal comportamiento permite la existencia de un nivel de agregación entre ambos antígenos, se evaluó si la presencia de estos agregados modifica el perfil cromatográfico de ambos antígenos de modo apreciable. Las corridas se realizaron en PBS, y por triplicado. Como proteína control se utilizó el HBsAg, el cual posee naturaleza física de PSV y diámetro de aproximadamente 20 nm. El HBsAg posee un perfil cromatográfico conocido. Adicionalmente, se empleó como control una variante de HBsAg agregado, obtenido por tratamiento químico, el cual modificó el perfil cromatográfico del HBsAg por un corrimiento en el sentido de la agregación de hasta 14 minutos en las condiciones ensayadas. La evaluación de la formulación combinada de los antígenos HBsAg y HBcAg no mostró modificación del perfil cromatográfico en las condiciones ensayadas, no se observó corrimiento del pico o aparición de una fracción agregada de ambos antígenos, sólo el ensanchamiento característico de la base del pico del HBsAg (Figura 19).

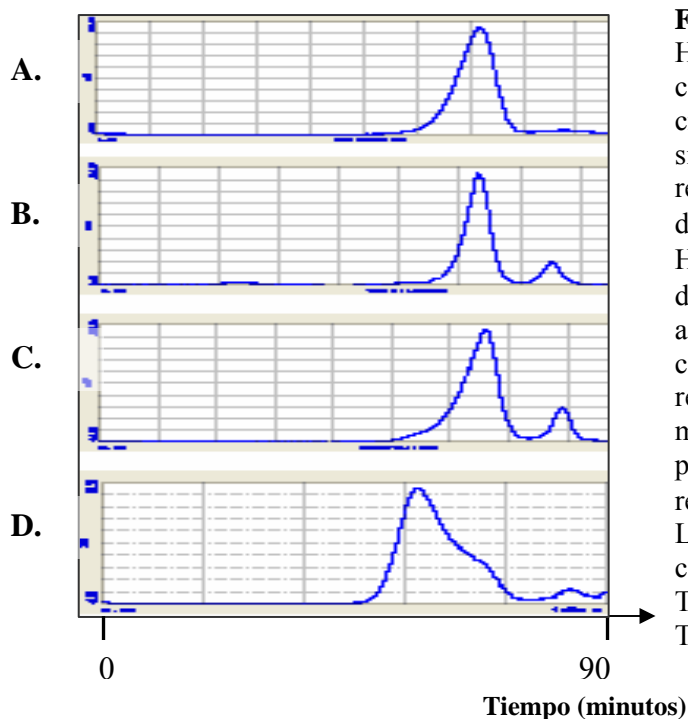


Figura 19. Perfil cromatográfico del HBcAg, el HBsAg y de la formulación combinada de ambos antígenos en cromatografía de exclusión molecular en sistema de alta presión. La corrida se realizó en una columna TSK G6000 de dimensiones 7.5x600 mm con **A.** 100 µg de HBsAg, **B.** 100 µg de HBcAg, **C.** 100 µg de HBsAg y 100 µg de HBcAg, **D.** HBsAg agregado mediante tratamiento químico con ciclodextrinas. Las corridas se realizaron en PBS, a un flujo de 0.25 mL/min para un tiempo total de 90 min. por corrida y la detección de la señal se realizó a una longitud de onda (λ)=280 nm. Los tiempos de retención de los picos correspondientes a los antígenos fueron: TR(A)=72.23 min, TR(B)=72.51 min, TR(C)= 73.15 min, TR(D)= 59.31 min.

4.6 Evaluación del efecto del HBcAg sobre la inmunogenicidad de una segunda variante del HBsAg por vía IN.

Con el objetivo de conocer si el HBcAg es capaz de potenciar la respuesta anti-HBsAg de una segunda variante del HBsAg obtenida en células de mamíferos, se diseñó el estudio de inmunogenicidad descrito en el acápite 3.13.5 en el cual se evaluaron formulaciones combinadas de la proteína HBcM492 y las dos variantes de HBsAg.

El resultado de la evaluación del nivel de IgG anti-HBsAg en el suero de los ratones inmunizados evidenció la capacidad del HBcAg para potenciar la respuesta de ambas variantes del HBsAg por la vía IN (Figuras 21, grupos 3 y 6). Sin embargo, se pudo comprobar un mayor efecto potenciador del HBcAg sobre la inmunogenicidad del HBsAg producido en el CIGB (grupo 3) respecto al producido por Berna Biotech (HBsAg-BB), representado por el grupo 6 ($p < 0.05$), no obstante a no existir diferencias en la respuesta inmune inducida por la ruta IM (Figuras 21, grupos 1 y 4).

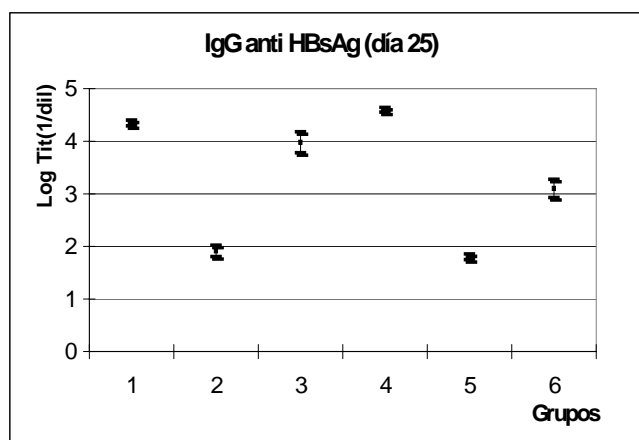


Figura 21. Respuesta de IgG anti-HBsAg en suero de ratones inoculados con formulaciones nasales del HBcAg (variante HBcM492) y dos variantes del HBsAg a los 10 días de la 2da dosis, La dosis empleada para todos los antígenos fue de 5 μg /ratón siguiendo un esquema de inoculaciones los días 0, 15 y 30. En la figura se representan los valores de Log MGT y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidades.

4.7 Estudio del efecto de la inoculación intranasal de formulaciones combinadas del HBsAg con antígenos heterólogos de interés vacunal

4.7.1 Evaluación del efecto del HBsAg sobre la inmunogenicidad del toxoide tetánico, el toxoide diftérico y *Bordetella pertussis* inactivada

A pesar de que los antígenos TD, TT y Bp han sido inoculados por rutas mucosales con anterioridad, no existe en la literatura ningún antecedente de la administración mucosal de formulaciones combinadas de estos antígenos con el HBsAg. Adicionalmente se debe señalar que los antígenos TD, TT y Bp son antígenos que han sido empleados frecuentemente en combinación con el HBsAg por la ruta parenteral como parte de formulaciones vacunales combinadas. Con la finalidad de conocer el efecto de la combinación de antígenos vacunales sobre la inmunogenicidad de cada uno en la formulación, se diseñó el estudio de inmunogenicidad que se presenta en el acápite 3.13.6, en el que se estudió el efecto de la coadministración nasal de las combinaciones de estos antígenos con el HBsAg. La respuesta inmune fue evaluada por ELISA para la detección de IgG específica contra estos antígenos en suero, lavados vaginales y homogenatos de pulmones de los ratones inmunizados.

Como resultado de la evaluación de la respuesta inmune a las 2 semanas de la tercera administración se verificó un incremento significativo de la respuesta de IgG en suero de los grupos inoculados por vía IN con las formulaciones combinadas con respecto a la respuesta inducida por el HBsAg en solución (grupos 1-7 vs grupo 8, Figura 22A). El grupo inoculado por vía IP con la formulación tetravalente indujo niveles de respuesta anti-HBsAg superior a la obtenida por los grupos 1-8 sugiriendo que aunque existe un efecto potenciador, este no es tan intenso como el que induce el HBcAg, que ha llegado a estar al nivel de los grupos 12 y 13, administrados por vía parenteral (Figura 22A).

Con respecto a la respuesta de IgG anti-TT y anti-TD en suero, se apreció un incremento altamente significativo en la inmunogenicidad resultante de la combinación de estos antígenos con el HBsAg, ya sea en formulaciones bivalentes que no contenían Bp (Figuras 22B y C, grupos 1 y 3, respectivamente) como en formulaciones trivalentes con o sin Bp. Se debe reconocer que la presencia de la Bp fue un factor adicional en la respuesta generada contra los toxoides en las formulaciones combinadas. Estas respuestas anti-TT y anti-TD llegaron a ser 10^3 veces superior ($p < 0.001$) con respecto a la inducida

por los grupos inoculados con igual dosis de los toxoides en PBS por vía IN cuando los toxoides fueron coadministrados con el HBsAg como con la bacterina Bp (Figuras 22B y C).

La respuesta inmune contra la bacterina Bp fue evaluada mediante la detección de los títulos contra la bacteria. La respuesta de IgG anti-BP en suero fue muy elevada en todos los grupos que recibieron este antígeno, sin embargo, el grupo 2, que recibió la mezcla de la Bp y el HBsAg generó una respuesta anti-Bp significativamente superior a la generada por la Bp en solución, representado en el grupo 10, (Figura 22D), manifestando un efecto potenciador aún sobre este antígeno que es tan inmunogénico.

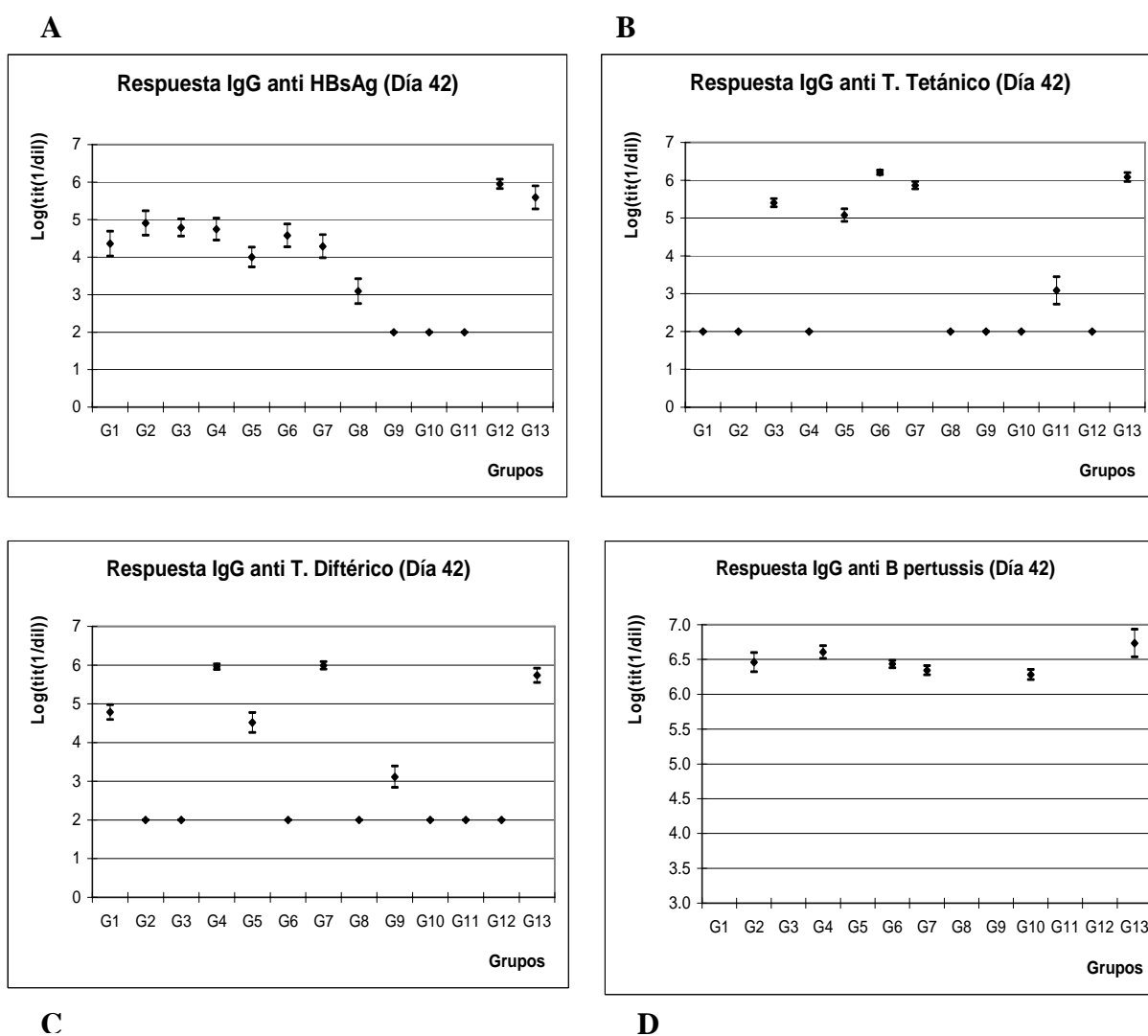


Figura 22. Evaluación de la respuesta de IgG en suero específica para: **A.** HBsAg, **B.** TT, **C.** TD, **D.** Bp. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones combinadas nasales (grupos 1-7) del HBsAg: G1. HBsAg y TD, G2. HBsAg y Bp, G3. HBsAg y TT, G4. HBsAg, TD y Bp, G5. HBsAg, TD y TT, G6. HBsAg, TT y Bp, G7. HBsAg, TT, TD y Bp. Los grupos del 8 al 11 recibieron los antígenos por separado: G8. HBsAg, G9 TD, G10. Bp, G11. TT. Los grupos 12 y 13 recibieron formulaciones parenterales G12. HBsAg vía IP, G13. HBsAg, TD, TT y Bp, adyuvadas en ALOOH. En la figura se representan los valores de Log MGT y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidades.

La respuesta de IgA evaluada en los lavados vaginales y en pulmones mostró un comportamiento similar en el caso de los toxoides, cualquier combinación de los toxoides y el HBsAg administrada por vía IN generó una respuesta de IgA anti-toxoides altamente significativa con respecto al grupo administrado en su formulación no combinada, representados por los grupos 9 y 11 (Figuras 23B y C y 24By C, respectivamente).

En el caso de la respuesta anti-Bp, también se evidenció su alta inmunogenicidad en la respuesta de IgA anti-Bp. Tanto en las formulaciones combinadas como en la simple se generaron fuertes respuestas, que sólo evidenciaron significación estadística a favor de los grupos inmunizados con las formulaciones combinadas en el caso de la respuesta de IgA anti-Bp en lavados vaginales (Figura 23D y 24D).

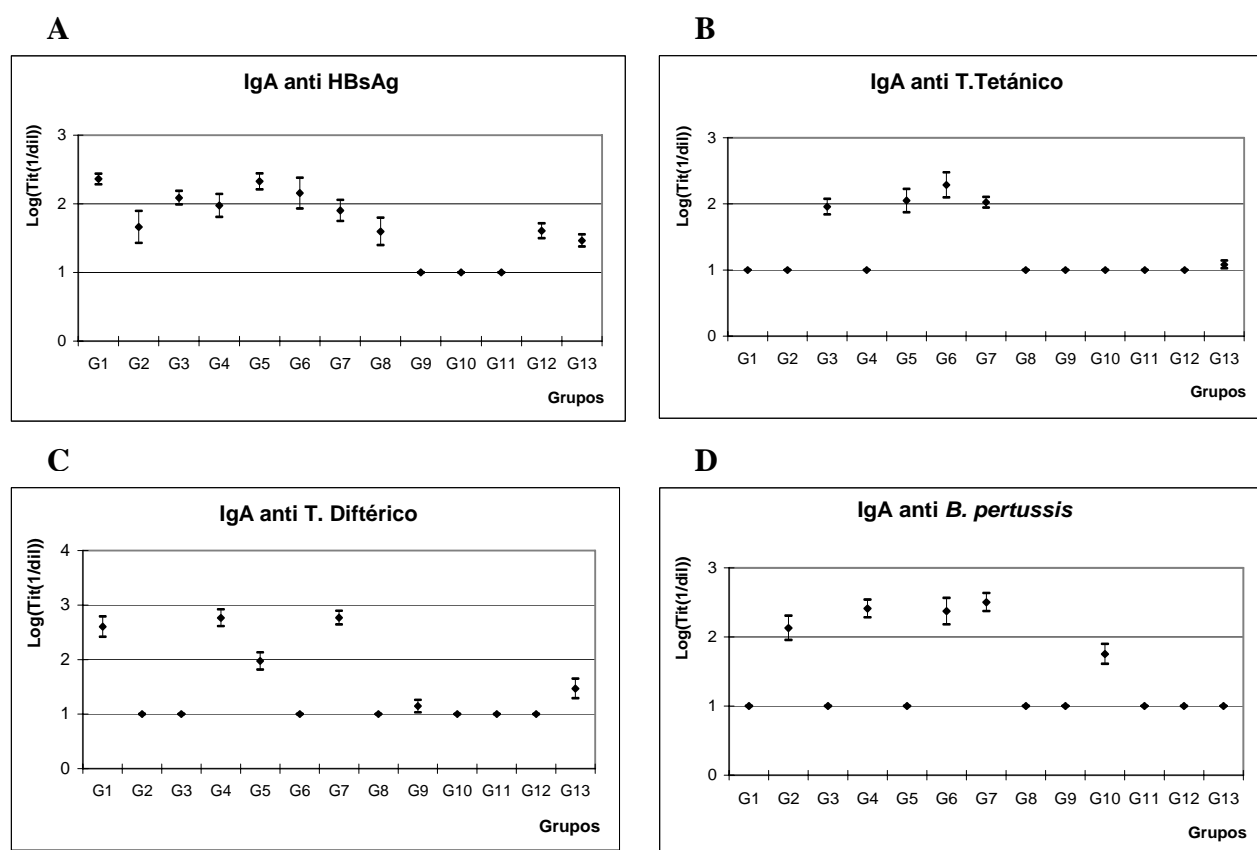


Figura 23. Evaluación en lavados vaginales de la respuesta de IgA específica para: **A.** HBsAg, **B.** TT, **C.** TD, **D.** Bp. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones combinadas nasales (grupos 1-7) del HBsAg: G1. HBsAg y TD, G2. HBsAg y Bp, G3. HBsAg y TT, G4. HBsAg, TD y Bp, G5. HBsAg, TD y TT, G6. HBsAg, TT y Bp, G7. HBsAg, TT, TD y Bp. Los grupos del 8 al 11 recibieron los antígenos por separado: G8. HBsAg, G9 TD, G10. Bp, G11. TT. Los grupos 12 y 13 recibieron formulaciones parenterales G12. HBsAg vía IP, G13. HBsAg, TD, TT y Bp, adyuvadas en ALOOH. Se representan los valores de Log MGT y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidades.

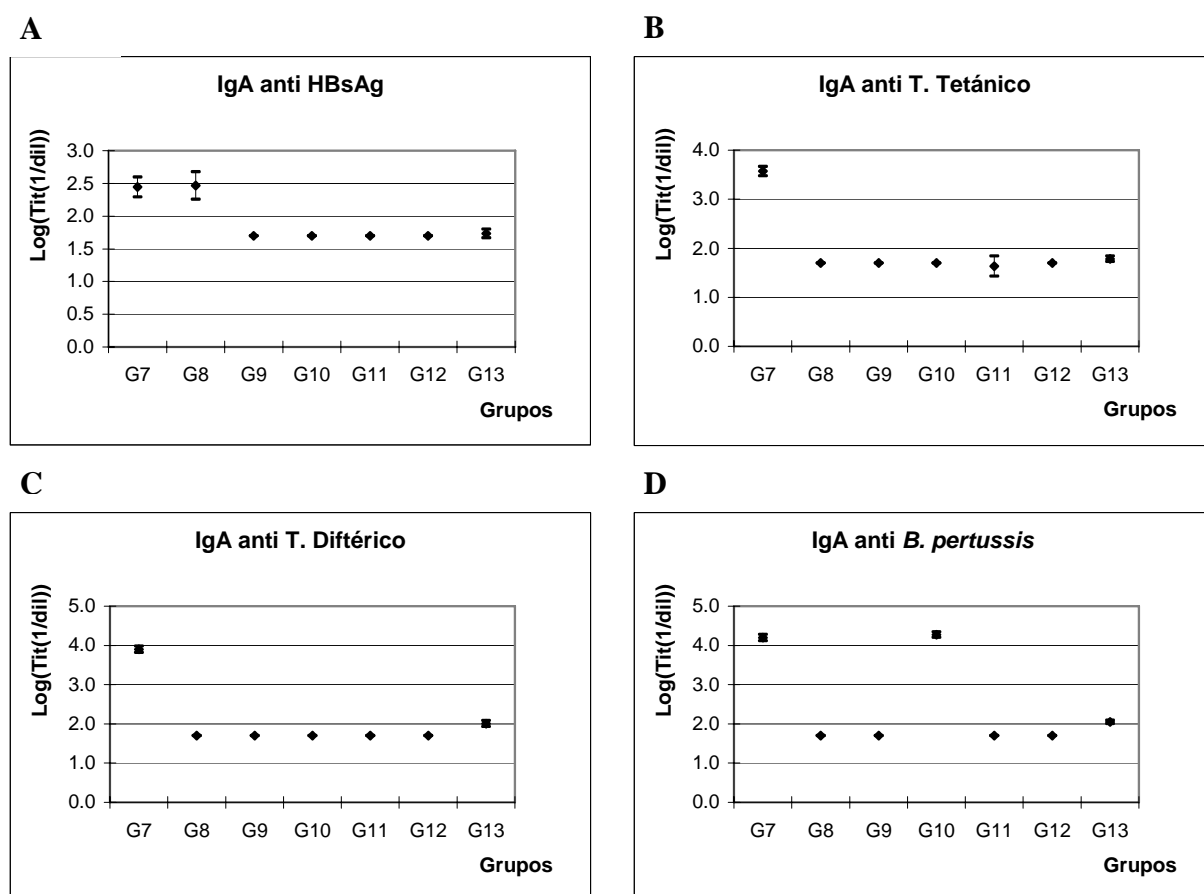


Figura 24. Evaluación en homogenatos pulmonares, de la respuesta de IgA específica para: **A.** HBsAg, **B.** TT, **C.** TD, **D.** Bp. Los ratones fueron inmunizados con formulaciones combinadas nasales (grupos 1-7) del HBsAg: G1. HBsAg y TD, G2. HBsAg y Bp, G3. HBsAg y TT, G4. HBsAg, TD y Bp, G5. HBsAg, TD y TT, G6. HBsAg, TT y Bp, G7. HBsAg, TT, TD y Bp. Los grupos del 8 al 11 recibieron los antígenos por separado: G8. HBsAg, G9 TD, G10. Bp, G11. TT. Los grupos 12 y 13 recibieron formulaciones parenterales G12. HBsAg vía IP, G13. HBsAg, TD, TT y Bp, ambos en ALOOH. Se representan los valores de Log MGT y el intervalo de confianza (95% de probabilidades).

La respuesta de IgA anti-HBsAg en lavados vaginales y muestras de pulmones fue similar en los grupos inmunizados con las formulaciones combinadas con respecto al grupo inmunizado con el HBsAg solo. Es bueno tener en cuenta que el efecto potenciador sobre el HBsAg en suero no fue tan pronunciado como el efecto obtenido sobre los toxoides producto de estas combinaciones. Para el día 100 en que se realizaron los lavados, la respuesta anti-HBsAg en suero no fue diferente entre los grupos inmunizados con las combinaciones (grupos 1-7) y la variante inmunizada con el HBsAg en solución (grupo 8) por lo que de cierta forma este resultado reproduce el comportamiento de la IgG anti-HBsAg en el suero.

4.7.2 Evaluación del efecto del HBsAg sobre la inmunogenicidad del antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis C (HCcAg).

Previamente se demostró que dos variantes del HBcAg son capaces de potenciar significativamente la inmunogenicidad del HBsAg cuando ambos antígenos son coadministrados por la vía nasal y que a su vez el HBsAg ejerce efecto potenciador sobre el HBcAg coadministrado. También se comprobó que el HBcAg es capaz de potenciar una variante de HBsAg relativamente diferente (que incluye las regiones Pre-S1 y Pre-S2). En el estudio de inmunogenicidad descrito en el acápite 3.13.5.2 se estudió la combinación del HBsAg y el antígeno de la nucleocápsida del virus de la hepatitis C, (HCcAg-120). Este antígeno contiene 120 aa de la secuencia del VHC y se purifica como un antígeno particulado recombinante producido en *Escherichia coli*.

El estudio de la respuesta de IgG anti-HBsAg mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en los títulos de los grupos inoculados por ambas rutas con las formulaciones combinadas, grupos 3 y 6, con respecto a los grupos en los que el HBsAg se administró en PBS por vía IN o en ALOOH por vía IM, grupos 2 y 4, respectivamente (Figura 25A). Como resultado de este estudio de inmunogenicidad se pudo comprobar que el HCcAg es inmunogénico cuando se administra por vía IN en PBS o adyuvado al ALOOH y administrado por vía IM. La coadministración con el HBsAg favoreció la respuesta de IgG anti-HCcAg, tanto por ruta IN como IM, sin embargo esta diferencia fue significativa sólo a partir de la coadministración de ambos antígenos por la vía IM adsorbidos al ALOOH (Figura 25B).

Con respecto a la respuesta de subclases de IgG anti-HBsAg, se pudo apreciar que esta es fundamentalmente de tipo IgG1 cuando el HBsAg se inocula en formulaciones simples, sin embargo la combinación con el HCcAg favoreció la inducción de una respuesta de tipo IgG2a de modo que por ambas rutas se redujo la razón IgG1 / IgG2a de modo significativo, incluso por la ruta IN el incremento de la respuesta de tipo IgG2a cambió el característico patrón en el que predomina la IgG1 por un patrón asociado a respuesta Th1 en el que la IgG2a fue la subclase dominante (Figuras 25C y E).

El análisis de la razón IgG1 / IgG2a de la respuesta anti-HCcAg no evidenció cambio ni variaciones significativas entre los grupos inmunizados con las combinaciones y sus respectivos controles. La respuesta anti-HCcAg induce niveles de IgG2a por encima de

los niveles de respuesta específica de tipo IgG1 (Figuras 25 D y F). Tanto la inmunogenicidad de esta partícula como la modulación en el sentido de la IgG2a en su patrón de subclases de IgG son características comunes del HBcAg y el HCcAg.

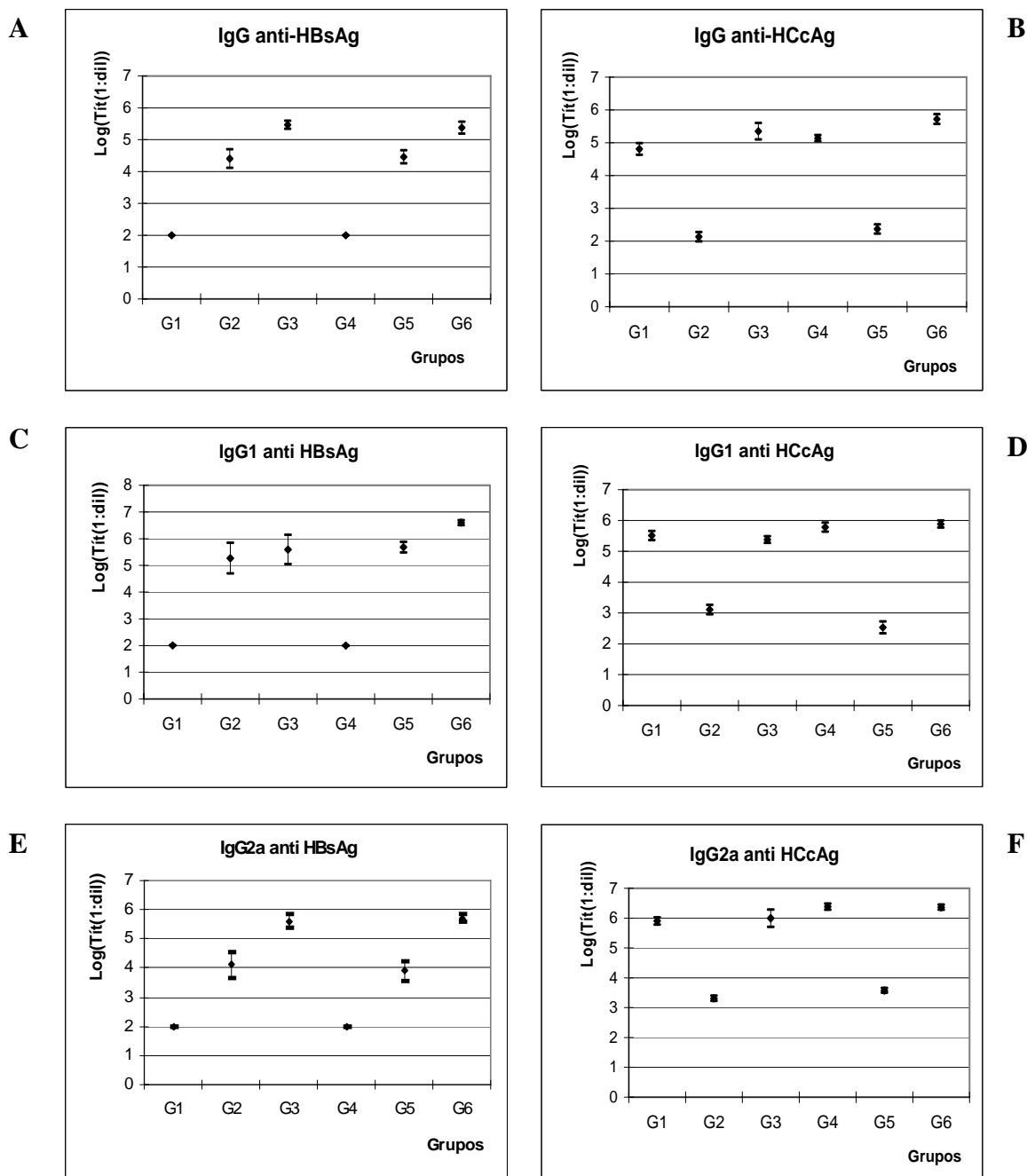


Figura 25. Respuesta de IgG específica para el HBsAg y el HCcAg en el suero de ratones inmunizados con formulaciones simples y combinadas. **A.** IgG anti-HBsAg, **B.** IgG anti-HCcAg, **C.** IgG1 anti-HBsAg, **D.** IgG1 anti-HCcAg, **E.** IgG2a anti-HBsAg, **F.** IgG2a anti-HCcAg. Las variantes ensayadas fueron: G1. HCcAg (IN), G2. HBsAg (IN), G3. HBsAg y HCcAg (IN), G4. HCcAg (IM), G5. HBsAg (IM), G6. HBsAg y HCcAg (IM). Por la vía IM los antígenos se inocularon adsorbidos en ALOOH 0.5 mg/mL. Las dosis empleadas fueron de 5 μ g HBsAg y 10 μ g de HCcAg por ratón. Se representan los valores de Log MGT y el intervalo de confianza para un 95% de probabilidades.

4.8 Inmunogenicidad por vía nasal de una formulación que contiene al HBsAg y al HBcAg en voluntarios saludables

Como parte del desarrollo de un candidato vacunal que contiene a los antígenos de la superficie y de la nucleocápsida del VHB se decidió evaluar la seguridad y la inmunogenicidad preliminar de una formulación de ambos antígenos en un estudio clínico Fase I, controlado, aleatorizado y a doble ciegas. Para este estudio fueron seleccionados 19 voluntarios saludables, los cuales recibieron la formulación combinada del HBsAg y el HBcAg o placebo de acuerdo a lo descrito en el acápite 3.13.7. Como resultado de la administración del preparado se evidenció la seguridad de esta preparación al no existir eventos adversos de consideración en el grupo inmunizado con la formulación combinada. Por otra parte, los eventos adversos no difirieron en proporción o intensidad entre ambos grupos de voluntarios.

No se produjeron reacciones adversas serias o inesperadas, ni desviaciones del rango normal de los parámetros hematológicos y de química clínica. Los eventos adversos locales fueron ligeros en un 97 % de los casos, reportándose fundamentalmente estornudos (34.1 %), rinorrea (12.2 %) y congestión nasal (9.8%). Sólo hubo un reporte de reacción vagal en un sujeto del grupo de estudio, sin embargo fue un evento de corta duración cuya relación con la administración del producto se consideró poco probable.

Tabla 4. Resumen de los resultados de inmunogenicidad del estudio clínico fase I de la formulación nasal combinada de los antígenos HBsAg y HBcAg. Se muestran los porcentos de seroconversión anti-HBcAg y de seroprotección anti-HBsAg (valores mayores de 10 UI/L de anticuerpos anti-HBsAg) en el suero de los voluntarios involucrados en el estudio.

Grupo/Día de la extracción	Vacuna HBcAg-HBsAg			Placebo		
	Día 0	Día 30	Día 90	Día 0	Día 30	Día 90
N	9	8	8	10	9	9
% Seroconversión anti-HBcAg	-	8 (100%)	8(100%)	-	-	-
% Seroprotección anti-HBsAg \geq 10 IU/L	-	2 (25%)	6 (75%)	-	-	-
MGT anti-HBsAg (UI/L)	-	7849.6	332.38	-	-	-

El estudio de la respuesta humoral evidenció la capacidad de la formulación combinada para generar una respuesta inmune contra ambos antígenos en voluntarios sanos, dado por un 100% de seroconversión anti-HBcAg en el suero de los vacunados desde la extracción posterior a la tercera dosis -al mes de comenzado el estudio. No se observó respuesta anti-HBcAg o anti-HBsAg en el grupo placebo. Por su parte la respuesta anti-HBsAg en voluntarios inmunizados alcanzó un 25% de títulos protectores (más de 10 UI/L) al mes de iniciado el estudio y un 75% después de la última dosis (Tabla 4).

4.9 Evaluación de la respuesta inmune inducida por formulaciones combinadas del HBsAg y del HBcAg por vía parenteral.

Con la finalidad de estudiar la capacidad del HBcAg para potenciar la respuesta de tipo Th1 de formulaciones administradas por vía parenteral, se diseñó el estudio de inmunogenicidad que se describe en el acápite 3.13.8. En el protocolo desarrollado se evaluaron varias formulaciones del HBsAg adsorbido a distintas variantes del adyuvante Algamulina. Adicionalmente, se evaluó la combinación del HBsAg y el HBcAg adsorbido a todas las variantes de Algamulina, e incluso una variante en PBS.

La evaluación de la respuesta de subclases de IgG anti-HBsAg después de la segunda dosis mostró una respuesta de IgG1 similar en todas las formulaciones adyuvadas del HBsAg ($p > 0.05$) (Figura 27A). Además, se pudo observar un incremento significativo de las subclases IgG2a e IgG2b para los grupos de ratones inoculados con la combinación del HBsAg y el HBcAg (Figura 27B y C, grupos 8-13), con respecto a los grupos en los que el HBsAg se administró sin el HBcAg (grupos 1-7). Este resultado evidenció que el HBcAg ejerce su efecto modulador también por la ruta parenteral, respecto al incremento de las subclases IgG2a e IgG2b. Los grupos placebo (14-16) no generaron respuesta de Ac. Posteriormente, se evaluó directamente en ensayos de respuesta celular si esta modulación en el patrón de subclases estuvo asociada a un incremento en la capacidad de secreción de IFN- γ y en la actividad linfoproliferativa. Resultó interesante comprobar que el grupo administrado con la combinación de antígenos del VHB (grupo 8) fue el único que generó respuestas positivas en el experimento de detección de IFN- γ en el sobrenadante de cultivo como resultado de la estimulación con el HBsAg, de los tres grupos inoculados con este antígeno, resultando positivas el 80% de las muestras (Figura 28A). En el caso del HBcAg se pudo comprobar una respuesta positiva en los ratones

inmunizados con este antígeno (grupo 8), y no se evidenció respuesta positiva en los ratones no inmunizados con el HBcAg (grupos 2 y 4).

La evaluación de la actividad linfoproliferativa anti-HBsAg también evidenció un incremento en el índice de estimulación de las células provenientes de los ratones inmunizados con la combinación de los antígenos (Figura 28B). La actividad proliferativa del antígeno de superficie evidenció un nivel bajo, no obstante resultó positivo de acuerdo al criterio de corte de índice de estimulación (IE)= 3, establecido en este estudio para el índice de estimulación.

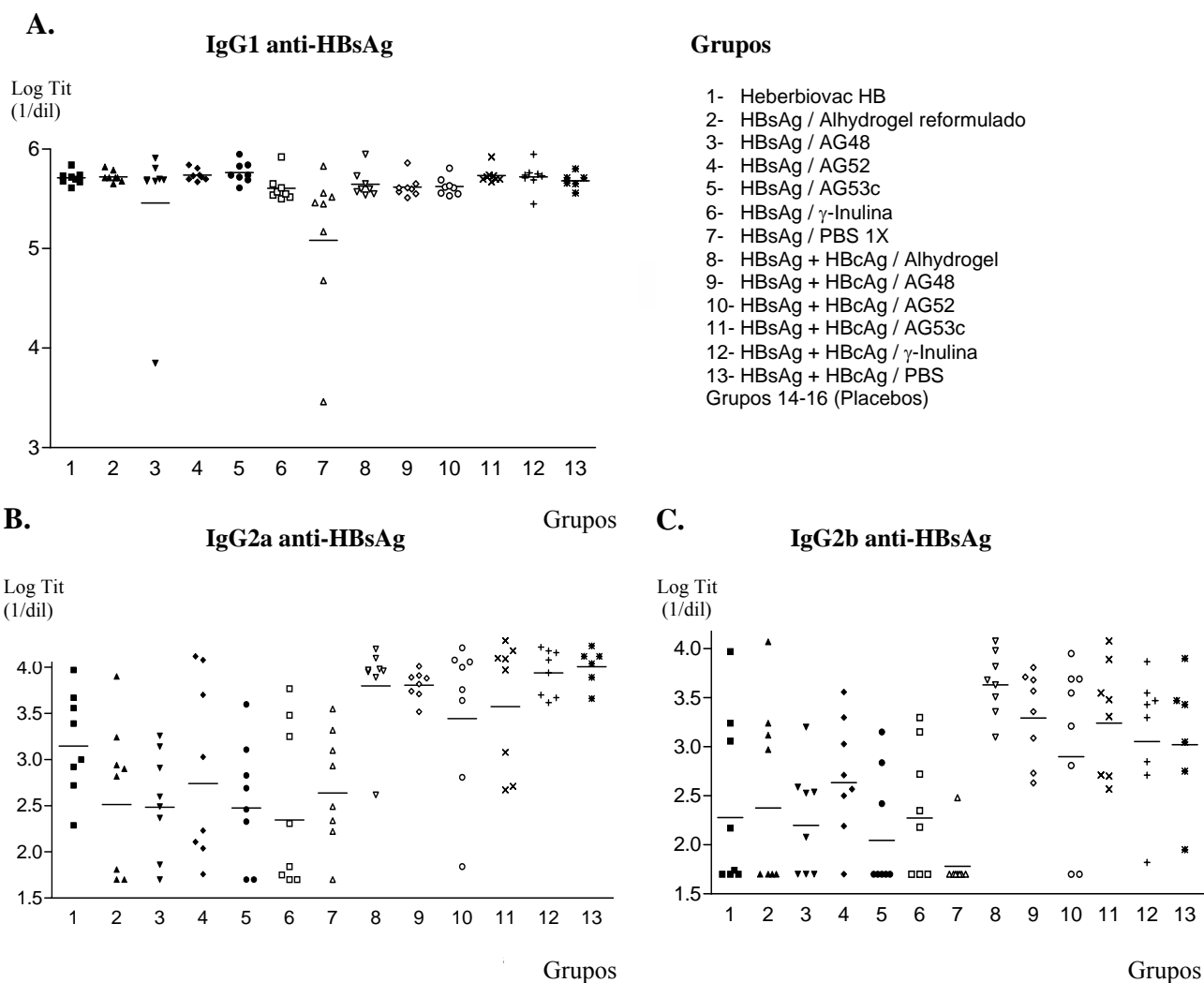


Figura 27. Evaluación de las subclases de IgG anti-HBsAg en suero de ratones inoculados con distintas formulaciones del HBsAg y el HBcAg adsorbidas a variantes de adyuvantes basados en el ALOOH o en PBS. **A.** IgG1, **B.** IgG2a y **C.** IgG2b. Los grupos ensayados se muestran en el cuerpo de la figura. La dosis empleada fue de 2 μ g de HBsAg y de 4 μ g de HBcAg. Los adyuvantes empleados se utilizaron a 0.5 mg/mL. Las inoculaciones se realizaron los día 0 y 28 y la extracción el día -2 y el día 56. En la figura se representan el logaritmo de los valores de título individuales. Los grupos placebo (14-16) no generaron respuesta de Ac detectable, no se representaron.

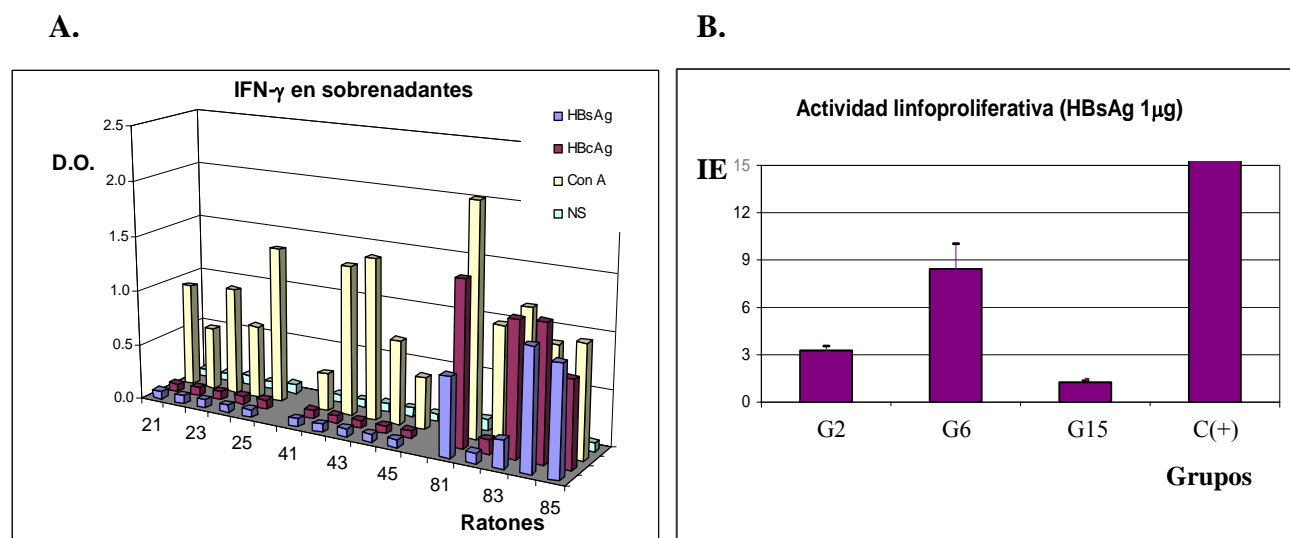


Figura 28. Estudio de la respuesta celular inducida por la formulación combinada del HBsAg y el HBcAg por vía IM. **A.** Evaluación de la secreción de IFN- γ por células de bazo en cultivo estimuladas con HBsAg, HBcAg, Con A y sin estimular. Los grupos estudiados fueron inmunizados con G2. 2 μ g de HBsAg en 0.5 mg/mL de ALOOH, G4. 2 μ g de HBsAg en AG52, G8. 2 μ g de HBsAg y 4 μ g de HBcAg en ALOOH. La estimulación de las células con los antígenos se realizó a 1 μ g/mL y la Con A se utilizó a 5 μ g/mL. Se representan los valores de DO resultantes del ELISA. **B.** Evaluación de la actividad proliferativa anti-HBsAg. Además de los grupos 2 y 8 se utilizó un grupo placebo (grupo 15) que recibió HBcAg en ALOOH (IM).

4.10 Respuesta inmune anti-HBsAg en ratones Balb/c y en ratones transgénicos inmunizados con las formulaciones combinadas administradas por vía IN y SC

Con el objetivo de conocer si la administración de las formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg es capaz de subvertir la tolerancia inmunológica anti-HBsAg e inducir la producción de respuesta de anticuerpos contra el HBsAg, se diseñó un estudio de inmunogenicidad en el que se inmunizaron ratones transgénicos que expresan el HBsAg de forma estable en suero y tejidos. La caracterización previa de estos ratones mostró la expresión del HBsAg en el suero durante más de 20 meses de vida y la ausencia de respuesta anti-HBsAg luego de 10 administraciones de la vacuna preventiva convencional que sólo contiene al HBsAg en ALOOH.

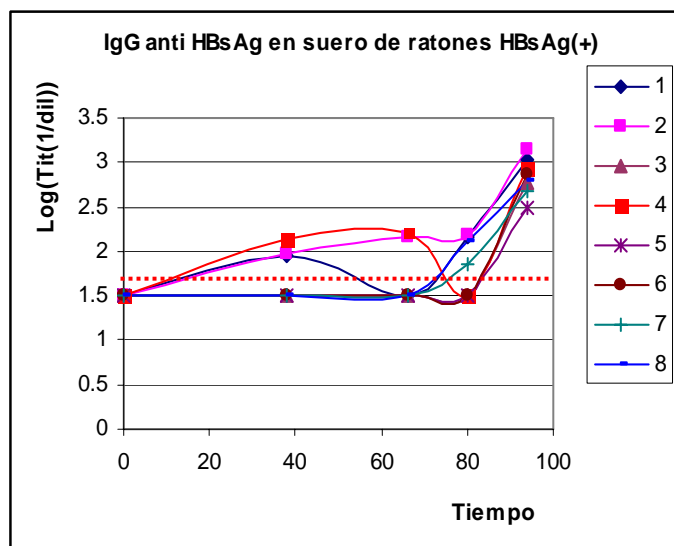
Como parte de este estudio, se inocularon ratones transgénicos simultáneamente con las formulaciones combinadas por las vías IN y SC, de acuerdo a lo descrito en el acápite 3.13.9.

El grupo de ratones Balb/c (no transgénicos) inoculados como control con las formulaciones combinadas generaron una respuesta de IgG anti-HBsAg que se

caracterizó por su rapidez e intensidad. Fue posible generar en ellos un 100% de seroconversión luego de una primera dosis, y títulos cercanos a los niveles de saturación (10^6) después de la tercera dosis (Datos no mostrados).

En el caso de los ratones transgénicos, se detectó seroconversión anti-HBsAg en los ratones inoculados con el tratamiento combinado y simultáneo por las vías IN y SC. La seroconversión comenzó desde la extracción posterior a la tercera dosis (Figura 30). De la tercera a la 6ta inoculaciones se observó la seroconversión a niveles bajos -entre 2 y 4 ratones (25%-50% del total). En la extracción posterior a la séptima dosis se logró detectar respuesta de IgG anti-HBsAg en el 100% de los ratones inmunizados. La media de los títulos estuvo por encima de 1:500 (1/dil). No se detectó respuesta de IgG en los ratones transgénicos o no transgénicos inoculados con las formulaciones placebo (No mostrado). Las extracciones luego de tercera, quinta y sexta inoculaciones se caracterizaron por niveles de respuesta cercanos al valor de corte (1:50), con negativización posterior a la seroconversión en dos casos. Fue después de la séptima dosis que culminan las fluctuaciones y se incrementan los niveles de títulos de modo generalizado (Figura 29).

Figura 29. Respuesta de IgG anti HBsAg en suero de los ratones HBsAg(+), inmunizados con las formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg, simultáneamente por las rutas IN y SC. Las inoculaciones fueron cada 14 días y la sangre se colectó a los 10 días después de la 3ra, la 5ta, la 6ta y la 7ma dosis. Cada curva representa la dinámica de aparición de la IgG en el suero de los ratones transgénicos. Sobre la línea de puntos, los valores son positivos con un título $> 1:50$.



El valor de 1.5 a tiempo 0 representa un nivel de título por debajo del valor de seroconversión, tomado arbitrariamente para representar la no existencia de Acs de tipo IgG anti-HBsAg al inicio del estudio en los ratones HBsAg(+).

5 DISCUSION

Los resultados presentados en este documento demuestran que es posible purificar al HBcAg como una PSV de naturaleza nucleoproteica y con un alto grado de pureza, lo que permitió desarrollar los estudios inmunológicos planificados.

Posteriormente, como resultado de los estudios de inmunogenicidad, se pudo demostrar en el modelo murino la generación de una respuesta inmune potente y de larga duración contra los antígenos HBsAg y HBcAg, a partir de la administración IN y parenteral del HBcAg y de las formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg. Adicionalmente, se colectaron evidencias de seguridad e inmunogenicidad como resultado de la administración de la formulación combinada de ambos antígenos en humanos.

En otro grupo de resultados, se demostró la capacidad de la ruta nasal para inducir una respuesta inmune potente cuando varios antígenos de interés vacunal fueron administrados por vía IN en formulaciones combinadas. Una característica importante de estas formulaciones lo constituyó la capacidad de unos antígenos para potenciar la respuesta de otros antígenos coadministrados.

5.1 Obtención de la nucleoproteína HBcM492 como PSV y con alta pureza

La experiencia internacional en el desarrollo de antígenos vacunales indica que la naturaleza físico-química de los antígenos está directamente relacionada con la intensidad y las características de la respuesta inmune inducida. En este sentido se ha podido demostrar que los antígenos capaces de formar partículas son muy inmunogénicos (**134-138**).

El proceso de purificación descrito en el acápite 3.11 permitió obtener al HBcAg como una nucleoproteína con un aspecto físico de PSV y con una talla muy similar a la del HBsAg (20-30 nm) según los resultados de ME y HPLC. La obtención de la proteína con estas características reprodujo resultados de otros laboratorios que han obtenido variantes de la nucleocápsida del VHB similares en cuanto a diámetro y aspecto físico (**139**). La importancia de este resultado radica en que una de las razones que explican la alta inmunogenicidad del HBcAg, natural o recombinante, es su estructura tridimensional (**21**). La disposición repetitiva, rígida y equidistante de las protuberancias en la superficie de la partícula del HBcAg favorece el entrecruzamiento de los receptores inmunoglobulínicos de una familia de células B que tiene un alto nivel de representación

en el repertorio inmunológico de ratones y humanos. Las células B que reconocen a este antígeno son capaces de activarse y convertirse en células presentadoras profesionales muy eficientes. Esta interacción de la partícula con la célula B permite su activación directa y justifica el comportamiento de este antígeno como un antígeno T-dependiente y T-independiente al mismo tiempo (21).

Por otra parte, la proteína HBeAg, que no forma partícula sino que es soluble, se relaciona con procesos de inducción de tolerancia, que incluso han sido reportados como uno de los principales mecanismos de persistencia de este virus (31).

Previo al inicio de este trabajo, prevaleció en los reportes de la literatura especializada la tendencia a purificar una variante truncada del HBcAg que no posee la región C-terminal. Esta región es responsable de la unión a los ácidos nucleicos. La eliminación de esta región de la proteína permitió eliminar el componente nucleotídico asociado (22). Sin embargo, en el desarrollo de este trabajo se preservó esta zona, y su material nuclear para su potencial uso como adyuvante, ya que se conocía desde antes del inicio de nuestro trabajo que el ácido nucleico proveniente de procariontes posee efecto inmunoestimulante, aunque las evidencias experimentales mostraban que este efecto se asociaba al ADN (140).

La presencia de material nuclear asociado a la partícula del HBcAg, específicamente ARN, concuerda con reportes previos que plantean que es el ARN el material predominante en el HBcAg recombinante (141). Tomando como referencia el PPM de ADN, la migración en el gel de agarosa para esta proteína fue similar a la reportada por Riedl y colaboradores (22), quienes además demostraron la presencia del material nuclear asociado a la proteína en geles de agarosa y su degradación producto del tratamiento con RNAsa (22).

5.2 Estudio de la inmunogenicidad de la proteína HBcM492 administrada a ratones Balb/c por diferentes vías de inoculación.

Un elemento inmunológico que caracteriza al HBcAg, natural o recombinante, es su alta inmunogenicidad en el modelo murino, así como en personas que han sido infectadas por el VHB (21). En humanos, la respuesta de IgG anti-HBcAg en suero se mantiene elevada muchos años después de la infección aguda. Por otra parte, en aquellos pacientes que

desarrollan la enfermedad crónica también se produce una fuerte respuesta anti-HBcAg que coexiste con niveles indetectables de anticuerpos anti-HBsAg (142).

Como resultado de la inoculación parenteral de niveles decrecientes de dosis de HBcM492 se pudo detectar respuestas de IgG contra este antígeno en suero de ratones inoculados con dosis muy bajas y a sólo 10 días de la primera inoculación. Este resultado evidenció la alta inmunogenicidad del HBcAg y la rápida generación de anticuerpos de tipo IgG anti-HBcAg, aspectos consistentes con las características inmunológicas del HBcAg reportadas en la literatura (20).

El papel fisiológico de la respuesta humoral anti-HBcAg es poco importante en la protección contra la infección por el VHB, entre otras cosas porque el mismo es un antígeno interior de este virus (142). Sin embargo, la respuesta humoral anti-HBcAg se utilizó en este estudio como un parámetro indicativo de la inmunogenicidad de este antígeno por las diferentes rutas. En adición, el estudio de las subclases de IgG a partir del cálculo de la razón IgG1: IgG2a puede ser utilizado por su asociación con el balance Th1:Th2 en el desarrollo de la respuesta inmune. De modo general, el balance de subclases de IgG1 e IgG2a inducido por la administración mucosal y parenteral del HBcAg es muy similar. La inoculación IN del HBcAg evidenció un reforzamiento en el perfil de subclases de IgG asociado al patrón de respuesta Th1 (20, 22). Este tipo de respuesta está asociada al incremento en la capacidad de secreción de IFN- γ e IL-12 por las células T y a la potenciación de la actividad citolítica de las células CD8+, que a su vez se relaciona con la resolución de la infección crónica por el VHB así como con el control viral durante la infección aguda (15).

La inducción de una respuesta inmune antiviral en los compartimentos mucosales del sistema inmune requiere de la administración mucosal de los antígenos. Esto está relacionado con la compartimentalización del sistema inmune mucosal (143-145). Este fenómeno explica la pobre respuesta inmune inducida en mucosas por la inoculación parenteral del HBcAg comparada con la generada por el grupo inmunizado con la proteína HBcM492 por vía IN, no obstante a que ambos grupos indujeron niveles de respuesta en suero que fueron similares durante todo el estudio. Este hecho es relevante si tenemos en cuenta que la transmisión del VHB ocurre en gran medida por contacto sexual (146, 147), y que aunque este virus tiene como órgano diana al hígado, se conoce

de la existencia de múltiples sitios de replicación extra-hepáticos localizados en compartimentos mucosales (**Revisado en 148**).

La superioridad de la respuesta inmune inducida en suero y en mucosas por vía IN con respecto a la generada por las otras vías de inmunización mucosal es consistente con los resultados obtenidos con otros antígenos en ratones y humanos (**149, 150**).

Las similitudes en el reconocimiento de epítopes lineales por sueros de los ratones inmunizados con las variantes HBcM492 y HBcRIV-2, y por sueros de pacientes infectados con el VHB, constituyen evidencias del correcto ensamblaje de la proteína HBcM492. La propiedad de activar células B específicas e inducir en ellas una fuerte actividad como CPA depende de la estructura de la partícula (**20, 21**). Es posible que este mecanismo sea útil en el escenario de la enfermedad crónica, ya que el HBcAg podría ser procesado por esta vía alternativa.

El presente trabajo es el primer estudio de inmunogenicidad realizado con la variante nucleoproteica del HBcAg administrada por vía mucosal. La respuesta inducida por la variante completa HBcM492 contrastó con un reporte previo que refiere la pobre inmunogenicidad de una proteína truncada y quimérica cuando es inoculada por la ruta IN (**151**). Estos resultados develan nuevas potencialidades para el uso del HBcAg en su variante nucleoproteica y particulada como inmunógeno y proteína portadora por la vía de inmunización IN. En la actualidad no existe ninguna proteína portadora para la inmunización IN que reúna las características de esta proteína.

5.3 Estudio de la inmunogenicidad de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg inoculadas por la vía IN

La potenciación de la respuesta inmune de anticuerpos anti-HBsAg en el suero de los ratones inmunizados por vía IN con la formulación combinada del HBcAg con el HBsAg se pudiera explicar por el efecto adyuvante del material nuclear asociado al HBcAg o por el efecto local de activación del sistema inmune producido por la alta inmunogenicidad del HBcAg. Independientemente de la causa, este resultado constituyó la primera demostración de la capacidad potenciadora del HBcAg empleado en una mezcla antigénica. En el momento en que se obtuvo este resultado se conocía la capacidad del HBcAg como proteína portadora (Revisado en **152**), sin embargo, esta fue la primera

ocasión en que se utilizó al HBcAg como parte de una mezcla simple, coadministrado con un segundo antígeno, en este caso el HBsAg.

El adyuvante que con mayor frecuencia se utiliza a nivel internacional como referencia para evaluar el efecto potenciador por las rutas mucosales es la TC. Esta proteína ejerce un efecto potenciador muy fuerte, pero no es posible utilizarla en seres humanos por sus efectos tóxicos (153). El HBcAg mostró un efecto potenciador de la respuesta sérica de IgG anti-HBsAg similar al obtenido con la TC. Este resultado evidencia que el efecto adyuvante del HBcAg tiene suficiente fortaleza como para considerar el uso de este antígeno como inmunopotenciador de formulaciones vacunales por vía IN.

El estudio de la respuesta contra las proteínas utilizadas como adyuvantes (HBcAg y TC) corroboró la alta inmunogenicidad mucosal de ambas proteínas e, incluso, evidenció el efecto potenciador del HBsAg sobre la inmunogenicidad del HBcAg. No por inesperado este efecto deja de ser lógico. Se conoce que el HBsAg posee una naturaleza fisicoquímica proteoliposomal/virosomal y este tipo de compuestos ha demostrado tener actividad adyuvante con anterioridad (154-156). Sin embargo, la coadministración con el HBsAg no incrementó la respuesta de IgG anti-TC en el suero de los animales inmunizados, por lo que podría sugerirse la existencia de un carácter selectivo en esta actividad potenciadora. No existe precedente en la literatura de este efecto adyuvante del HBsAg, aunque esta proteína también ha sido utilizada ampliamente como proteína portadora (157).

La introducción de un adyuvante en una formulación vacunal suscita el problema de la inducción de una respuesta inmune contra el adyuvante. En el caso de un adyuvante proteico, –como es el caso de los toxoides empleados como adyuvantes mucosales (158), se generaría una respuesta inmune tanto humoral como celular que no está dirigida contra el patógeno contra el cual se pretende inmunizar. En el caso del HBcAg, se introduce en la formulación un antígeno cuya capacidad adyuvante se suma al efecto de la respuesta inmune específica. Se ha demostrado que la respuesta celular anti-HBcAg puede ser útil desde el punto de vista terapéutico en el control del VHB (101).

Un artículo publicado durante el desarrollo de este trabajo evidenció una diferencia importante en la respuesta inmune y la capacidad adyuvante del HBcAg completo (183 aa) y el truncado. La eliminación de la región de unión a los ácidos nucleicos varió el

patrón de subclases de IgG inducido por esta proteína, favoreciendo la generación de una respuesta de tipo Th2, y eliminando la capacidad de potenciar al HBsAg cuando ambos antígenos son coadministrados por vía parenteral **(22)**. Este resultado fue muy esclarecedor, y ofreció explicación a los resultados obtenidos en nuestro trabajo. El efecto del ARN como adyuvante e inmunomodulador se explica por su capacidad de unirse a receptores específicos para el ARN en la superficie de células presentadoras (receptor Toll 3), y a la señal de activación resultante **(20)**.

El reconocimiento del péptido que contiene los 8 aa finales de la región C-terminal en la variante HBcRIV-2 por los sueros de los ratones inmunizados con esta variante, permite predecir que la inserción de epítopes B homólogos o heterólogos en esta región es viable por su exposición, y además por preservar la capacidad adyuvante y la alta inmunogenicidad mucosal del HBcAg recombinante. Esta región es la más alejada del epítipo inmunodominante (aa 78-83), responsable del reconocimiento y activación directa de las células B específicas y del carácter T-independiente de esta partícula. Este reconocimiento está directamente relacionado con su potente inmunogenicidad **(159)** y no descartamos que también esté relacionado con su actividad adyuvante.

Uno de los elementos en el estudio de los adyuvantes o de cualquiera de los componentes de una formulación es la racionalidad de las dosis empleadas. Desde el punto de vista experimental, no encontramos que el incremento de la dosis de HBcAg, evaluado en tres proporciones respecto al HBsAg (1:1, 1:2 y 1:4) haya favorecido la respuesta inmune contra el HBsAg o contra el HBcAg de modo significativo, ni en suero ni en lavados mucosales. Por esta razón, el desarrollo ulterior de la formulación nasal se basó en la variante de proporciones 1:1 entre ambos antígenos. Esta variante ofrece una mayor economía de recursos.

Otro elemento de importancia, relacionado con el anterior, es la larga duración de la respuesta inmune inducida por las formulaciones combinadas administradas por vía IN. A los 270 días de iniciado el estudio, aún es detectable el efecto adyuvante sobre la respuesta de anticuerpos anti-HBsAg. Este es un elemento fundamental, pues la inmunización contra el VHB debe garantizar una inmunidad duradera, sobre todo un nivel de anticuerpos que garantice la seroprotección por un largo tiempo **(160)**.

El hecho de que esta evaluación se realizara de conjunto con la evaluación de los distintos niveles de dosis del HBcAg permitió asegurar que la respuesta anti-HBsAg va disminuyendo con igual pendiente en todos los grupos, por lo que tampoco se justifica un incremento en la cantidad de “HBcAg adyuvante” para garantizar una respuesta más duradera de IgG anti-HBsAg en suero.

5.4 Estudio de la respuesta celular inducida por la administración nasal de la formulación combinada de los antígenos del VHB

La reducción que se evidenció en la razón IgG1:IgG2a anti-HBsAg puede ser explicada por la contribución del efecto modulador del componente ARN. Este efecto ha sido reportado para distintos adyuvantes de naturaleza nucleotídica (161). La reducción en la razón IgG1:IgG2a fue tan marcada que se invirtió el patrón de las subclases de IgG, induciéndose una respuesta en la que predominó la subclase IgG2a para las dos líneas de ratones evaluadas. Este resultado fue consistente con el incremento en la respuesta celular producto de la inmunización con la formulación combinada. El resultado del ELISPOT también fue consistente con los resultados anteriores de patrón de subclases y con el incremento de la actividad proliferativa. La detección de este tipo de respuestas abre las potencialidades de la inmunización IN con la formulación combinada al área de la inmunización terapéutica, y específicamente en el caso del tratamiento de la infección crónica por el VHB. El control de este virus se relaciona con el desarrollo de una respuesta inmune celular potente y multiespecífica (4).

La detección por técnicas de ME de transmisión de la presencia de agregados de las partículas del HBsAg y el HBcAg en las formulaciones combinadas, pudiera explicar el comportamiento inmunológico de la formulación. La agregación entre ambos antígenos puede ser el resultado de la tendencia natural a la agregación observada para ambos antígenos por separado, los que pudieran interactuar entre si en un medio líquido por medio de interacciones no covalentes. Con anterioridad se ha descrito que el HBsAg producido en *Pichia pastoris* tiene la capacidad de formar agregados de partículas (162) durante el proceso de producción. También se ha descrito que la unión natural entre el HBsAg y el HBcAg ocurre a partir de la interacción de la proteína de la envoltura del virus con la nucleocápsida (163). No descartamos que este mecanismo también esté relacionado con la agregación, sin embargo, la partícula de HBsAg producida en el CIGB

no posee las regiones pre-S, donde se encuentran sitios importante en el reconocimiento entre ambos antígenos (163). La unión del HBsAg al HBcAg puede beneficiar la inmunogenicidad del HBsAg puesto que la unión física del antígeno al adyuvante produce un incremento en la inmunogenicidad del antígeno (164).

Por otra parte, se conoce que el HBcAg es rápidamente asimilado del medio por las células B en un proceso mediado por el entrecruzamiento de receptores en la superficie de esta célula y el envío de señales intracelulares de activación que provocan la secreción de IgM e IgG, y la regulación positiva de la producción de moléculas coestimuladoras por las células B (21, 23). No descartamos que al estar unido el HBsAg al HBcAg, ambas partículas transiten por este tipo de mecanismo, lo cual podría ser una vía alternativa en el procesamiento del HBsAg. En un escenario donde las células dendríticas tienen afectaciones funcionales (165), como es el caso de la hepatitis B crónica, este mecanismo podría constituir una vía alternativa de presentación antigénica.

La inmunización de la formulación combinada del HBcM492 y el HBsAg producido en células de mamíferos demostró que el efecto potenciador del HBcAg no se limita a su interacción con el HBsAg producido en el CIGB. No obstante, fue posible apreciar que el efecto potenciador sobre la respuesta de IgG anti-HBsAg en suero fue superior en la combinación con el HBsAg producido en *Pichia pastoris*. Consideramos que esto ocurre por la mayor inmunogenicidad mucosal del HBsAg-CIGB con respecto al HBsAg-BB, que se pudo apreciar después de la segunda dosis (resultado no mostrado)

5.5 Estudio del efecto de la inoculación IN de formulaciones combinadas del HBsAg con antígenos heterólogos de interés vacunal

La demostración previa del efecto potenciador del HBsAg sobre la respuesta inmune anti-HBcAg inducida por la formulación nasal combinada propició el estudio de nuevos antígenos cuya naturaleza físico-química difiere respecto al HBcAg. Este es el caso de los toxoides tetánico y diftérico, así como de la bacteria inactivada Bp. La experiencia previa de estudios realizados con estos antígenos no recoge una formulación que combine al HBsAg por la vía IN con ninguno de estos antígenos. De hecho el HBsAg es utilizado por la ruta IN a nivel mundial con posterioridad a los estudios iniciales realizados en el CIGB (109), por lo que la evaluación de formulaciones multivalentes por la vía IN con este antígeno resultaba un campo desconocido. Sin embargo, la combinación del HBsAg con

el HBcAg sugería la capacidad de la ruta IN para favorecer la respuesta de ambos antígenos cuando eran coadministrados, contrario a quienes pudieran pensar que podría existir una competencia entre los antígenos por los sitios de captura como las criptas a nivel de amígdalas y las células M asociadas al epitelio mucosal (166).

La capacidad inmunopotenciadora del HBsAg, demostrada por el incremento de la respuesta de IgG en suero y de IgA en mucosas contra los antígenos coadministrados, demostró que es posible el diseño de formulaciones multivalentes en las que pueden coinocularse no sólo PSV, sino también pudieran incluirse antígenos solubles y bacterias inactivadas, los que podrán recibir un efecto potenciador como resultado de esta coadministración. En este estudio se pudo observar que, aparte del efecto potenciador que reciben los antígenos solubles ensayados -el TT y el TD-, por el cual la respuesta de IgG anti-TT y anti-TD en suero se potencia entre 50 y 100 veces debido a la coadministración de los mismos con el HBsAg, la adición de la Bp incrementó los niveles de respuesta a valores similares a los obtenidos con la vacuna tetravalente control. Este efecto se reporta por primera vez en la literatura.

Este tipo de interacción entre antígenos vacunales podría evitar el uso de adyuvantes mucosales, optimizando la respuesta inmune a partir del efecto potenciador entre los propios antígenos de la composición. El uso de adyuvantes siempre es un riesgo de toxicidad adicional que en ocasiones ha obstaculizado el desarrollo de vacunas inoculadas por vía IN (167).

Los resultados de IgG en suero obtenidos a partir de la coadministración del HBsAg y el HCcAg por la vía IN mostraron una gran similitud con aquellos obtenidos a partir de la coadministración del HBsAg y el HBcAg. A la luz de nuestros resultados y el reporte de Riedl y colaboradores (22), este comportamiento resulta lógico si se tiene en cuenta que ambas nucleocápsidas se obtuvieron en *Escherichia coli* como nucleoproteínas, con aspecto físico de PSV y utilizando un método de purificación que preservó el contenido nucleotídico y la estructura particulada de este antígeno.

También se pudo comprobar un efecto potenciador por parte del HBsAg sobre la respuesta anti-HCcAg a nivel de IgG total, lo que fue consistente con el efecto potenciador del HBsAg sobre el HBcAg, sobre los antígenos solubles y sobre la bacterina. En nuestra opinión, este efecto adyuvante del HBsAg sobre diferentes tipos

antigénicos nos aleja de una posible explicación relacionada con la afinidad natural al HBcAg, y nos sugiere que se relaciona con su naturaleza lipoproteica / virosomal (168).

5.6 Inmunogenicidad por vía nasal de una formulación que contiene al HBsAg y al HBcAg en voluntarios saludables

La realización del estudio clínico Fase I, controlado, aleatorizado y a doble ciegas evidenció la seguridad de la formulación combinada de los antígenos del VHB administrada por vía IN. El análisis de la respuesta inmune inducida en los voluntarios mostró la capacidad del HBcAg para inducir una rápida respuesta inmune. Todos los voluntarios que recibieron la formulación generaron respuesta de anticuerpos anti-HBcAg en suero a sólo un mes de iniciado el estudio.

El nivel de respuesta anti-HBsAg inducido por la administración IN de los antígenos del VHB no es comparable aún con la intensidad de los títulos que se generan con la vacuna parenteral. Sin embargo los resultados obtenidos son alentadores al existir un alto porcentaje de seroprotección en humanos. Este no fue el primer estudio que se realizó con el HBsAg por vía IN. Anteriormente, se ensayó la formulación basada en el HBsAg y el polisacárido inmunopotenciador Acemanano, en un estudio promovido por el CIGB. Ese estudio evidenció la seguridad de la formulación, sin embargo, logró un porcentaje bajo de respuesta anti-HBsAg en suero, solamente 1 voluntario (10%) resultó seroprotegido (169).

El resultado alcanzado en este trabajo con la formulación combinada de los antígenos HBsAg y HBcAg es relevante, dado que aún existen varios aspectos de la formulación que deben ser optimizados. Por ejemplo, se deben optimizar aspectos como la cantidad de antígeno por dosis, el número de inoculaciones, y la frecuencia de las inmunizaciones. Desde el punto de vista de la formulación se debe estudiar la posibilidad de utilizar mucoadhesivos y otros compuestos promotores de la absorción, de igual forma se pueden explorar las potencialidades de la inmunización con formulaciones en polvo, que actualmente es un área de rápido desarrollo (170). El uso de dispositivos que favorecen una mejor deposición de los antígenos y una mayor nebulización en cada actuación (171) también es motivo de estudio a nivel internacional.

En la actualidad no existen alternativas terapéuticas efectivas y las que existen son extremadamente costosas, y se encuentran lejos del alcance de la mayor parte de los

pacientes. A partir de los resultados obtenidos en ratones y en humanos, consideramos que la inoculación mucosal de los antígenos del VHB puede aplicarse en el campo de la inmunización terapéutica contra este virus. La inmunoterapia contra la hepatitis B es un campo que se desarrolla con fuerza, no obstante los resultados aún son modestos **(172)**.

En sus condiciones actuales este producto puede combinarse con la estimulación parenteral para favorecer un reforzamiento de su inmunogenicidad. Se ha descrito previamente que la administración simultánea mucosal-parenteral permite la potenciación de la respuesta inmune a los antígenos en ambos compartimentos del sistema inmune **(173)**.

Existen múltiples razones científicas que hacen de un candidato vacunal administrado por vía mucosal un producto atractivo para su uso en la terapéutica. Aproximadamente el 80% de las células del sistema inmunológico están asociadas al sistema inmune mucosal. Aunque la administración parenteral induce una fuerte respuesta en compartimentos sistémicos, sólo induce una respuesta marginal a nivel de mucosas, -lo cual se comprueba con los resultados presentados en este trabajo. Sin embargo, la inoculación mucosal de antígenos puede generar una respuesta tanto en compartimentos sistémicos como mucosales **(174)**.

Para seleccionar un candidato vacunal terapéutico que potencie la respuesta inmune por vía de mucosas se han tenido en cuenta algunas características de la infección por el VHB. Por ejemplo, el VHB es un virus hepatotrópico, sin embargo, existen órganos asociados al sistema inmune mucosal que son infectados, como el estómago, el colon, las gónadas y las glándulas salivales, entre otros (Revisado en **148**). También se ha comprobado que el HBeAg se secreta en la saliva **(175)**, lo que pudiera ser considerado como una vía de utilización del mecanismo de inducción de tolerancia oral como una estrategia viral para la inducción de tolerancia contra sus antígenos. La potenciación de una respuesta anti-HBV con un patrón Th1 por vía intranasal podría ejercer un efecto modulador sobre la respuesta inmune que se genera a partir del reconocido efecto tolerogénico del HBeAg en sangre **(25)**, controlando de una manera más efectiva al virus presente en los compartimentos sistémico y mucosal.

Por último, un elemento importante que no debe dejarse de mencionar es el relacionado con la fuerte respuesta de anticuerpos anti-HBcAg en sangre de los pacientes crónicos. El

alto nivel de anticuerpos anti-HBcAg en el suero de los pacientes portadores crónicos del VHB coexiste con un estado de tolerancia inmunológica en la respuesta celular anti-HBcAg (25). Este estado de tolerancia se manifiesta de diferentes formas que van desde la depleción de células efectoras, la regulación negativa de sus funciones hasta niveles de regulación tan finos como la desorganización de los lípidos asociados al receptor de las células T, lo que regula negativamente la señal resultante (176). La respuesta de anticuerpos contra el HBcAg se sugiere que constituye un mecanismo para impedir que el HBcAg sea detectado por las células B, cuya presentación eficiente es contraproducente para el virus (21). De este modo la administración parenteral del HBcAg pudiera estar limitada por la presencia de importantes niveles de anticuerpos anti-HBcAg que podrían impedir su procesamiento óptimo. La inmunización mucosal (IN) ofrece compartimentos en los que el encuentro de los antígenos con las células presentadoras no se afecta por la inmunidad sistémica concomitante, este es el caso de las invaginaciones de las células M en el epitelio mucosal. Estas estructuras han evolucionado para favorecer que el antígeno pueda entrar en contacto con las células presentadoras de forma rápida y protegida de la inmunidad sistémica (177). Este aspecto podría ser fundamental en la subversión de una respuesta inmune en la que existen múltiples afectaciones, tanto entre las células presentadoras como entre las efectoras (178-184).

5.7 Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones por formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg inoculadas por vía parenteral

El HBcAg impuso su patrón de respuesta por vía parenteral, no obstante a estar coadministrado de conjunto con múltiples adyuvantes simultáneamente. Se favoreció un incremento en el nivel de los títulos de las subclases asociadas a la respuesta Th1, lo cual fue consistente con el efecto del HBcAg por vía IN. Este resultado también es consistente con la modulación de la respuesta cuando otros adyuvantes son combinados en formulaciones adyuvantes con el ALOOH (60).

El incremento en los valores de IFN- γ es muy importante en una estrategia terapéutica contra la infección crónica por el VHB, ya que se ha descrito el fenómeno conocido como “eliminación viral mediada por citoquinas”, que explica la eliminación viral sin causar daño celular producto de la secreción de IFN- γ y de otras citoquinas asociadas a la

respuesta Th1 (**185-187**). Este tipo de respuesta sería muy conveniente producto de que lo ideal es eliminar al virus sin generar daño histológico.

Por su parte la respuesta proliferativa corroboró los resultados obtenidos en los experimentos de evaluación de subclases y en el ELISA de IFN- γ en sobrenadantes de cultivo. Podemos concluir de este grupo de experimentos que la coadministración del HBcAg por vía parenteral también favorece un reforzamiento del tipo de respuesta Th1.

Reproduciendo el efecto potenciador inducido por vía IN a partir de la coadministración de los antígenos del VHB con antígenos heterólogos, se han obtenido una serie de resultados a nivel de laboratorio que muestran el efecto potenciador e inmunomodulador de estos antígenos sobre proteínas heterólogas coadministradas. Estos resultados son objeto de tesis de otro compañero (**188, 189**).

5.8 Respuesta inmune anti-HBsAg en ratones transgénicos inmunizados con las formulaciones combinadas administradas simultáneamente por las vías IN y SC

En el escenario en los ratones transgénicos el HBsAg se comporta como un autoantígeno. Este modelo animal ha sido empleado con frecuencia durante el desarrollo de candidatos vacunales terapéuticos y en estudios de la inmunopatogénesis viral (**190-193**).

Los resultados de la literatura especializada, en ratones que han sido inmunizados con proteínas, han sido modestos (**194-195**). Aunque se ha publicado que es posible inducir respuesta anti-HBsAg en suero, esto sólo se logró mediante la administración de 12 inoculaciones de 10 μ g del HBsAg en adyuvante completo de Freund por vía IP, generando aproximadamente un 15% de seroconversión. A partir de la imposibilidad del uso de este adyuvante en humanos por su alta reactogenicidad (**196**), se desarrollaron estrategias vacunales como la inmunización con ADN, lipopéptidos y con células dendríticas (**197-199**), las que también han tenido resultados modestos y contradictorios.

La obtención en nuestros estudios de un nivel de seroconversión del 100% luego de la séptima dosis sugiere que aun existen posibilidades para el uso terapéutico de los inmunógenos proteicos. No obstante, se deben realizar nuevos estudios para conocer aspectos de la respuesta inmune celular inducida por las formulaciones combinadas.

La dinámica de aparición de los anticuerpos en estos ratones transgénicos aporta datos de interés a la polémica actual relacionada con el número de inoculaciones requeridas para

lograr un tratamiento inmunoterapéutico eficaz en pacientes con infección crónica por el VHB. Los estudios clínicos desarrollados hasta este momento han evaluado un rango muy amplio de inoculaciones, sin embargo la tendencia actual es a conducir estudios con múltiples inoculaciones por paciente (200, 201). Observando la dinámica de desarrollo de la respuesta humoral en este modelo animal y teniendo en cuenta los ensayos fallidos que han sido realizados, consideramos que los tratamientos vacunales diseñados con finalidad terapéutica podrían beneficiarse de la inclusión del HBcAg a las formulaciones vacunales y del incremento en el número de administraciones.

5.9 Consideraciones generales

La coadministración de los antígenos recombinantes HBsAg y HBcAg, tanto por vía IN como por vías parenterales, favorece el incremento en la respuesta inmune contra ambos. De modo general, la coadministración de antígenos nucleoproteicos y el HBsAg modula la respuesta anti-HBsAg en el sentido Th1. Finalmente, la administración de la formulación de los antígenos HBsAg y HBcAg permitió subvertir la tolerancia a la respuesta inmune anti-HBsAg en un modelo de ratón transgénico que expresa el HBsAg en suero. Consideramos que estos resultados pueden ser útiles en el desarrollo de candidatos vacunales con interés terapéutico. Un segundo uso de estas formulaciones podría estar dirigido al diseño de candidatos vacunales para situaciones particulares que no encuentran solución a partir del uso de la vacuna preventiva actual, como es el caso de los pacientes con inmunodeficiencias, los individuos vacunados que no responden a la vacuna actual, así como los pacientes con afecciones renales en servicios de hemodiálisis y otros grupos de riesgo.

En el futuro próximo se requerirá de la implementación de nuevas tecnologías de administración IN, así como el desarrollo de la formulación combinada. Se requerirá del estudio de diferentes esquemas de administración y la evaluación de diferentes dosis de los antígenos en humanos. La ruta parenteral podría utilizarse en el desarrollo de formulaciones preventivas, así como en el uso combinado con las formulaciones nasales en los estudios de vacunación terapéutica. La optimización de las formulaciones actuales y el desarrollo de una estrategia clínica adecuada permitirán obtener nuevos productos a partir de los resultados anteriormente expuestos.

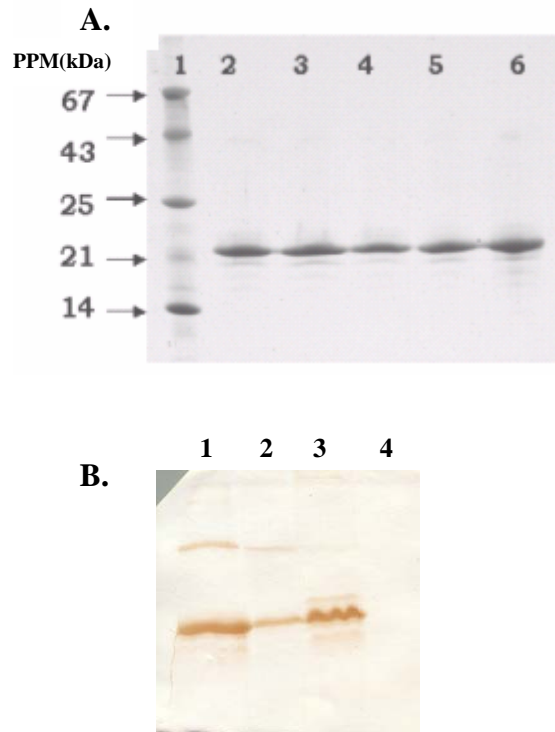
6 CONCLUSIONES

1. La proteína HBcM492 se obtiene como una nucleoproteína con aspecto físico de PSV y características antigénicas similares al antígeno de la nucleocápsida natural, lo que favorece su empleo como candidato vacunal.
2. La administración IN del HBcAg induce en ratones una potente respuesta inmune anti-HBcAg, tanto en el compartimento sistémico como a nivel de mucosas, caracterizada por una rápida respuesta de IgG y la coexistencia de una fuerte respuesta humoral y celular.
3. La coadministración nasal o parenteral del HBsAg con antígenos de naturaleza nucleoproteica en ratones produce un incremento en la respuesta inmune contra ambos antígenos, caracterizada por su larga duración y el reforzamiento del patrón Th1.
4. La coadministración nasal del HBsAg y otros antígenos de interés vacunal incrementa la inmunogenicidad de los antígenos presentes en la formulación, este fenómeno se produce para combinaciones del HBsAg con antígenos disímiles como PSV, proteínas solubles y bacterinas, y ocurre tanto a nivel de mucosas como en el compartimento sistémico, lo que pone de manifiesto la adyuvanticidad del HBsAg.
5. La inoculación intranasal de la formulación combinada HBsAg: HBcAg en humanos induce una respuesta inmune humoral contra ambos antígenos en un porcentaje elevado de los voluntarios inmunizados.
6. La inoculación simultánea y repetida de formulaciones combinadas del HBsAg y el HBcAg por las rutas IN y SC permite subvertir la tolerancia de las células B en los ratones transgénicos que expresan al HBsAg.

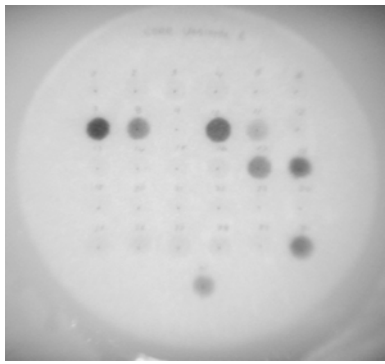
7 RECOMENDACIONES

1. Estudiar en los ratones transgénicos al HBsAg y al VHB, que son tolerantes al HBcAg, la importancia relativa de la vía IN y la parenteral, así como los aspectos relacionados con la respuesta celular inducida en estos animales y las posibles afectaciones sobre sus órganos.
2. Emplear las propiedades adyuvantes de los antígenos de la superficie y de la nucleocápsida del VHB en el desarrollo de una estrategia de inmunización terapéutica contra la hepatitis B crónica, que se beneficie de las propiedades inmunológicas de las formulaciones combinadas de ambos antígenos.
3. Emplear las propiedades adyuvantes de los antígenos del VHB en el desarrollo de formulaciones vacunales contra patógenos en los que se requiere inducir una potente respuesta humoral y celular, o contra aquellos que tienen en las mucosas su puerta de entrada o un sitio de replicación.
4. Implementar estudios en animales robustos durante la optimización de las formulaciones intranasales y propiciar el empleo de dispositivos que mejoren la disponibilidad del antígeno, su localización en la mucosa y la dispersión de la formulación.

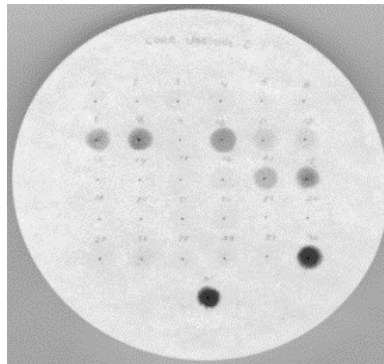
8 Anexos



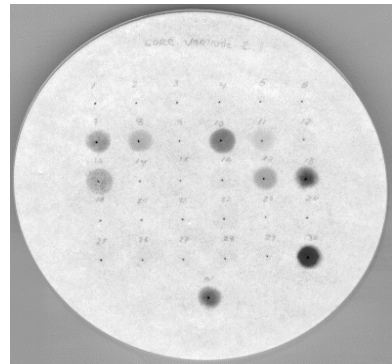
Anexo 1. Análisis por electroforesis de proteínas y *western blot* de la pureza e identidad molecular del HBcAg, purificado de acuerdo al proceso descrito en 3.11. **A.** Estudio por electroforesis de proteínas de la pureza de los lotes de HBcAg al final del proceso de purificación. Carril 1. PPM, 2-5. Lotes producidos de HBcAg. 6. Control positivo, **B.** Estudio de la identidad molecular del HBcAg mediante electroforesis y *western blotting* contra un suero policlonal de conejo con reactividad anti-HBcAg. Carril 1. 5 μ g de HBcAg (HBc M492), 2 y 3. Biomásas de Fermentaciones de 50L y de 5L que expresan HBcM492. 4. Biomasa negativa.



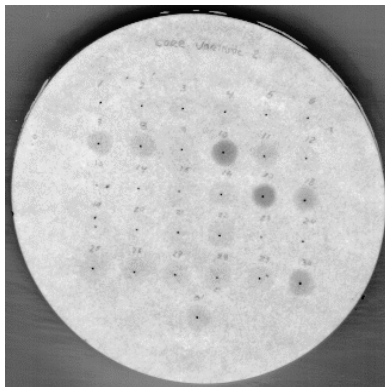
S1.



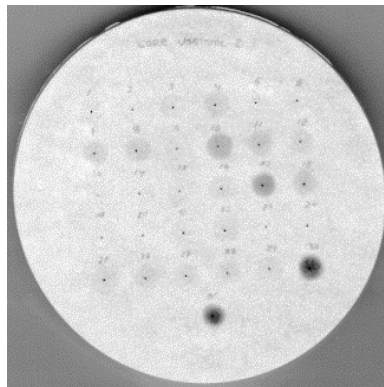
S2.



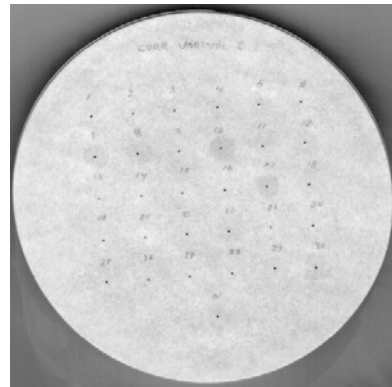
S3.



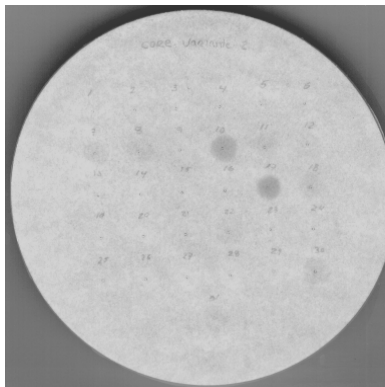
S4.



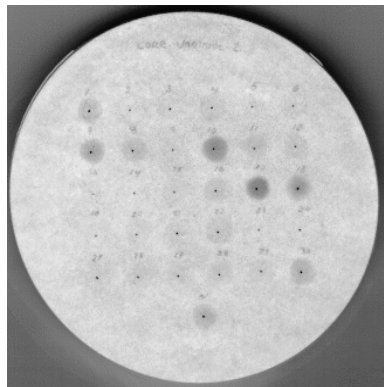
S5.



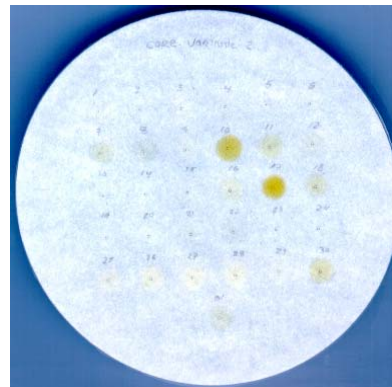
S6.



S7.



LV.1



LV.2

Anexo 2. Reconocimiento de los péptidos sobrelapados que cubren la secuencia del HBcAg (variante HBcRIV-2) por sueros y lavados mucosales de ratones inmunizados con este antígeno o su formulación con el HBsAg. Los sueros (**S**) ensayados se correspondieron con ratones inmunizados con 5 µg de: **S1.** HBcRIV-2 vía IN, **S2.** HBcM492 vía IN, **S3.** HBcRIV-2 en ALOOH vía SC, **S5.** HBcRIV-2 y HBsAg vía IN, **S6.** HBsAg vía IN (reactividad negativa anti HBcAg). Los sueros humanos empleados fueron: **S4.** Mezcla de sueros humanos con reactividad positiva anti-HBcAg y **S7.** Mezcla de sueros humanos con reactividad negativa al HBcAg. Los lavados vaginales (**LV**) ensayados fueron obtenidos en ratones inmunizados con: **LV1.** HBcM492 y HBsAg por vía IN, **LV2.** HBsAg vía IN (Lavados con reactividad negativa anti-HBcAg). El símbolo (*) se corresponde con la aparición de un color amarillo, diferente a la coloración azul positiva.

9 Bibliografía

- 1- Zuckerman JN. Protective Efficacy, Immunotherapeutic Potential, and Safety of Hepatitis B Vaccines. *J Med Virol* 2006; 78: 169–177.
- 2- Osborn MK, Lok AS. Antiviral options for the treatment of chronic hepatitis B. *J Antimicrob Chemother.* 2006; 57: 1030-34.
- 3- Hui CK, Lau GKK. Advances in immunomodulating therapy of HBV infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 24-29.
- 4- Pol S, Michel ML. Therapeutic vaccination in chronic hepatitis B virus carriers. *Expert Rev Vaccines* 2006; 5: 707-16.
- 5- Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967; 66: 924-31.
- 6- Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200: 365-73.
- 7- Feinstone SM, Kapikian AZ, Purceli RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a virus-like antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026-8.
- 8- Hilleman MR. Overview of the pathogenesis, prophylaxis and therapeusis of viral hepatitis B, with focus on reduction to practical applications. *Vaccine* 2001; 19: 1837-48.
- 9- Ganem, D and Schneider RJ (2001). Hepadnaviridae: the viruses and their replication. In *Fields Virology*, 4th edn (Knipe DM, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Roizman B and Straus SE Eds.), pp. 2923-69. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- 10- Sonveaux N, Thines D, Ruyschaert JM. Characterization of the HBsAg particle lipid membrane. *Res Virol.* 1995; 146: 43-51.
- 11- Leroux-Roels G, Cao T, De Knibber A, Meuleman P, Roobrouck A, Farhoudi A, Vanlandschoot P, Desombere I. Prevention of hepatitis B infections: vaccination and its limitations. *Acta Clin Belg.* 2001; 56: 209-19.
- 12- Vanlandschoot P, Van Houtte F, Hoek F, Nieuwland R, Leroux-Roels G. Saccharomyces cerevisiae-derived HBsAg preparations differ in their attachment to monocytes, immunosuppressive potential, and T-cell immunogenicity. *J Med Virol* 2003; 70 :513-9.
- 13- Muzio V, E.Pentón, M.Palou, G.Fontirrochi, M.Nazábal, M.J.González, A.Beldarrain, G.Padrón, V.Ramirez, A.García, C.Ruiz, G.M.Izquierdo, L.Herrera, C.Duarte, J.García, J.de la Riva, L.Pérez. Method for the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*, expression vectors and transformed microorganisms. N° 912000742. 1991. European patent application.
- 14- Tleugabulova D, Falcon V, Sewer M, Penton E. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* 1998; 716: 209-19.
- 15- Bertoletti A, Naoumov NV. Translation of immunological knowledge into better treatments of chronic Hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 115-124.
- 16- Vanlandschoot P, Roobrouck A, Van Houtte F, Leroux-Roels G. Recombinant HBsAg, an apoptotic-like lipoprotein, interferes with the LPS-induced activation of ERK-1/2 and JNK-1/2 in monocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 297: 486-91.
- 17- Vanlandschoot P, Van Houtte F, Roobrouck A, Farhoudi A, Leroux-Roels G. Hepatitis B virus surface antigen suppresses the activation of monocytes through interaction with a serum protein and a monocyte-specific receptor. *J Gen Virol* 2002; 83: 1281-9.
- 18- Cheng J, Imanishi H, Morisaki H, Liu W, Nakamura H, Morisaki T, Hada T. Recombinant HBsAg inhibits LPS-induced COX-2 expression and IL-18 production by interfering with the NFkappaB pathway in a human monocytic cell line, THP-1. *J Hepatol.* 2005; 43: 465-71.
- 19- Desombere I, Willems A, Gijbels Y, Leroux-Roels G. Partial delipidation improves the T-cell antigenicity of hepatitis B virus surface antigen. *J Virol.* 2006; 80: 3506-14.
- 20- Vanlandschoot P, Cao T, Leroux-Roels G. The nucleocapsid of the hepatitis B virus: a remarkable immunogenic structure. *Antiviral Res* 2003; 60: 67-74.
- 21- Milich DR, Chen M, Schodel F, Peterson DL, Jones JE, Hughes JL. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 14648–53.

- 22- Riedl P, Stober D, Oehninger C, Melber K, Reimann J, Schirmbeck R. Priming Th1 Immunity to Viral Core Particles Is Facilitated by Trace Amounts of RNA Bound to Its Arginine-Rich Domain. *J Immunol* 2002; 168: 4951–59.
- 23- Lazdina U, Alheim M, Nystrom J, Hultgren C, Borisova G, Sominskaya I, Pumpens P, Peterson DL, Milich DR, Sallberg M. Priming of cytotoxic T cell responses to exogenous hepatitis B virus core antigen is B cell dependent. *J Gen Virol* 2003; 84: 139-46.
- 24- Hilleman MR. Critical review and outlook: pathogenesis, prevention, and treatment of hepatitis and hepatocarcinoma caused by hepatitis B virus. *Vaccine* 2003; 21: 4626-4649.
- 25- Milich D, Liang TJ. Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2003; 38: 1075-81.
- 26- Chen HL, Chang CJ, Kong MS, Huang FC, Lee HC, Lin CC, Liu CC, Lee IH, Wu TC, We SF. Pediatric fulminant hepatic failure in endemic areas of hepatitis B infection: 15 years after universal hepatitis B vaccination. *Hepatology* 2004; 39: 58-63.
- 27- Cote PJ, Korba BE, Miller RH, Jacob JR, Baldwin BH, Hornbuckle WE, Purcell RH, Gerin JL. Effects of age and viral determinants on chronicity as an outcome of experimental woodchuck hepatitis virus infection. *Hepatology* 2000; 31: 190-200.
- 28- Petrosillo N, Ippolito G, Solfrosi L, Varaldo PE, Clementi M, Manzin A. Molecular epidemiology of an outbreak of fulminant hepatitis B. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2975-81.
- 29- Tanaka, S, Yoshiba M, Iino S, Fukuda M, Nakao H, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. A common-source outbreak of fulminant hepatitis B in hemodialysis patients induced by precore mutant. *Kidney Int.* 1995; 48: 1972-1978.
- 30- Chu CM, Yeh CT, Lee CS, Sheen IS, Liaw YF. Precore stop mutant in HBeAg-positive patients with chronic hepatitis B: clinical characteristics and correlation with the course of HBeAg-to-anti-HBe seroconversion. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 16-21.
- 31- Chen M, Sällberg M, Hughes J, Jones J, Guidotti LG, Chisari FV, Billaud JN, Milich DR. Immune Tolerance Split between Hepatitis B Virus Precore and Core Proteins. *J Virol* 2005; 79: 3016-27.
- 32- Billaud JN, Peterson D, Schodel F, Chen A, Sallberg M, Garduno F, et al. Comparative antigenicity and immunogenicity of hepadnavirus core proteins. *J Virol* 2005; 79: 13641–55.
- 33- Billaud JN, Peterson D, Barr M, Chen A, Sallberg M, Garduno F, et al. Combinatorial approach to hepadnavirus-like particle vaccine design. *J Virol* 2005; 79: 13656–66.
- 34- Billaud JN, Peterson D, Lee BO, Maruyama T, Chen A, Sallberg M, Garduno F, Goldstein P, Hughes J, Jones J, Milich D. Advantages to the Use of Rodent Hepadnavirus Core Proteins as Vaccine Platforms. *Vaccine* 2007; 25: 1593–1606.
- 35- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1118-29.
- 36- World Health Organization. Geographic pattern of hepatitis B prevalence. Sitio de internet: <http://www.who.int/vaccines-surveillance/graphics/htmls/hepbprev.htm>. Acceso 7 de Abril del 2007.
- 37- Lok AS, McMahon B. Chronic hepatitis B: Update of recommendations. *Hepatology* 2004; 39: 857-861.
- 38- Hui CK, Lau GK. Immune system and hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34: S44-8.
- 39- Realdi G, Fattovich G, Hadziyannis S, et al. Survival and prognostic factors in 366 patients with compensated cirrhosis type B: a multicenter study. *J Hepatol* 1994; 21: 656-666.
- 40- Bosch FX, Ribes J, Díaz M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. *Gastroenterology* 2004; 127: S5-S16.
- 41- Nguyen MH, Keeffe EB. Screening for hepatocellular carcinoma. *J Clin Gastroenterol* 2002; 35: S86-S91.
- 42- Puoti M, Torti C, Bruno R, Filice G, Carosi G. Natural history of chronic hepatitis B in co-infected patients. *J Hepatol* 2006; 44: S65-70.
- 43- Fattovich G. Natural history and prognosis of hepatitis B. *Semin Liver Dis* 2003; 23: 47-58.
- 44- Guidotti LG, Chisari FV. Cytokine-induced viral purging -role in viral pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 388-91.
- 45- Nakamura I, Nupp JT, Cowlen M, Hall WC, Tennant BC, Casey JL, Gerin JL, Cote PJ. Pathogenesis of experimental neonatal woodchuck hepatitis virus infection: chronicity as an outcome of infection is associated with a diminished acute hepatitis that is temporally deficient for

- the expression of interferon gamma and tumor necrosis factor-alpha messenger RNAs. *Hepatology* 2001; 33: 439-47.
- 46- Baron JL, Gardiner L, Nishimura S, Shinkai K, Locksley R, Ganem D. Activation of a nonclassical NKT cell subset in a transgenic mouse model of hepatitis B virus infection. *Immunity* 2002; 16: 583-94.
 - 47- Kakimi K, Guidotti LG, Koezuka Y, Chisari FV. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Exp Med* 2000; 192: 921-30.
 - 48- Kakimi K, Lane TE, Wieland S, Asensio VC, Campbell IL, Chisari FV, Guidotti LG. Blocking chemokine responsive to gamma-2/interferon (IFN)-gamma inducible protein and monokine induced by IFN-gamma activity in vivo reduces the pathogenetic but not the antiviral potential of hepatitis B virus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 2001; 194: 1755-66.
 - 49- Zang GQ, Zhou XQ, Yu H, Xie Q, Zhao GM, Wang B, Guo Q, Xiang YQ, Liao D. Effect of hepatocyte apoptosis induced by TNF-alpha on acute severe hepatitis in mouse models. *World J Gastroenterol* 2000; 6: 688-92.
 - 50- Menne S, Roneker CA, Roggendorf M, Gerin JL, Cote PJ, Tennant BC. Deficiencies in the acute-phase cell-mediated immune response to viral antigens are associated with development of chronic woodchuck hepatitis virus infection following neonatal inoculation. *J Virol* 2002; 76: 1769-80.
 - 51- Webster GJ, Reignat S, Maini MK, Whalley SA, Ogg GS, King A, Brown D, Amlot PL, Williams R, Vergani D, Dusheiko GM, Bertolotti A. Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 2000; 32: 1117-24.
 - 52- Chu CM. Natural history of chronic hepatitis B virus infection in adults with emphasis on the occurrence of cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: E25-E30.
 - 53- Lok AS, Heathcote, EJ, Hoofnagle JH. Management of hepatitis B: 2000 - summary of a workshop. *Gastroenterology* 2001; 120: 1828-53.
 - 54- Chu CJ, Hussain M, Lok ASF. Quantitative serum HBV DNA levels during different stages of chronic hepatitis B infection. *Hepatology*. 2002; 36: 1408-1415.
 - 55- Lok AS, McMahon B. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001; 34: 1225-41.
 - 56- Chen YC, Sheen IS, Chu CM, Liaw YF. Prognosis following spontaneous HBsAg seroclearance in chronic hepatitis B patients with or without concurrent infection. *Gastroenterology* 2002; 123: 1084-89.
 - 57- Funk ML, Rosenberg DM, Lok AS. World-wide epidemiology of HBsAg-negative chronic hepatitis B and associated precore and core promoter variants. *J Viral Hepat* 2002; 9: 52-61.
 - 58- Hsu YS, Chien RN, Yeh CT. Long-term outcome after spontaneous HBsAg seroconversion in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2002; 35: 1522-27.
 - 59- Aristegui J, Usonis V, Coovadia H, Riedemann S, Win KM, Gatchalian S, Bock HL. Facilitating the WHO expanded program of immunization: the clinical profile of a combined diphtheria, tetanus, pertussis, hepatitis B and *Haemophilus influenzae* type b vaccine. *Int J Infect Dis* 2003; 7: 143-51.
 - 60- Beran J. Editorial of the "vaccination issue" of KMIIL--what have demonstrated Prevenar and Fendrix vaccines. *Klin Mikrobiol Infekc Lek* 2006; 12: 87-90.
 - 61- Singh M, Ugozzoli M, Kazzaz J, Chesko J, Soenawan E, Mannucci D, Titta F, Contorni M, Volpini G, Del Giudice G, O'Hagan DT. A preliminary evaluation of alternative adjuvants to alum using a range of established and new generation vaccine antigens. *Vaccine* 2006; 24: 1680-86.
 - 62- Dupont J, Altclas J, Lepetic A, Lombardo M, Vazquez V, Salgueira C, Seigelchifer M, Arndtz N, Antunez E, von Eschen K, Janowicz Z. A controlled clinical trial comparing the safety and immunogenicity of a new adjuvanted hepatitis B vaccine with a standard hepatitis B vaccine. *Vaccine* 2006; 24: 7167-74.
 - 63- Halperin SA, Dobson S, McNeil S, Langley JM, Smith B, McCall-Sani R, Levitt D, Nest GV, Gennevois D, Eiden JJ. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine* 2006; 24: 20-6.
 - 64- Payette PJ, Ma X, Weeratna RD, McCluskie MJ, Shapiro M, Engle RE, Davis HL, Purcell RH. Testing of CpG-optimized protein and DNA vaccines against the hepatitis B virus in chimpanzees for immunogenicity and protection from challenge. *Intervirology* 2006; 49: 144-51.
 - 65- Feng L, Zhou XJ, Wang SC, Jiang Y, Qi XR. Immunogenicity of single-dose HBsAg-PLGA controlled release microspheres in mice. *Yao Xue Xue Bao* 2006; 41: 132-37.

- 66- Pasricha N, Datta U, Chawla Y, Singh S, Arora SK, Sud A, Minz RW, Saikia B, Singh H, James I, Sehgal S. Immune responses in patients with HIV infection after vaccination with recombinant Hepatitis B virus vaccine. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 65-69.
- 67- Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, Krieg AM, Cameron DW. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS* 2005; 19: 1473-79.
- 68- Qin W, Jiang J, Chen Q, Yang N, Wang Y, Wei X, Ou R. CpG ODN enhances immunization effects of hepatitis B vaccine in aged mice. *Cell Mol Immunol* 2004; 1: 148-52.
- 69- Goyal AK, Rawat A, Mahor S, Gupta PN, Khatri K, Vyas SP. Nanodecoy system: a novel approach to design hepatitis B vaccine for immunopotentiality. *Int J Pharm* 2006; 309: 227-33.
- 70- Vangala A, Bramwell VW, McNeil S, Christensen D, Agger EM, Perrie Y. Comparison of vesicle based antigen delivery systems for delivery of hepatitis B surface antigen. *J Control Release*. 2007; Jan 27; [Epub ahead of print]
- 71- Sung JJ, Lik-Yuen H. HBV-ISS (Dynavax). *Curr Opin Mol Ther* 2006; 8: 150-55.
- 72- Iloeje UH, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Chen CJ; Risk Evaluation of Viral Load Elevation and Associated Liver Disease/Cancer-In HBV (the REVEAL-HBV) Study Group. Predicting cirrhosis risk based on the level of circulating hepatitis B viral load. *Gastroenterology* 2006; 130: 678-86.
- 73- Chen CJ, Yang HI, Su J, Jen CL, You SL, Lu SN, Huang GT, Iloeje UH; REVEAL-HBV Study Group. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level. *JAMA* 2006; 295: 65-73.
- 74- Hoofnagle JH, di Bisceglie AM. The treatment of chronic viral hepatitis. *N Engl J Med* 1997; 336: 347-56.
- 75- Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX. Peginterferon alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 2005; 352: 2682-95.
- 76- Marcellin P, Lau GK, Bonino F. Peginterferon alfa-2a alone, lamivudine alone, and the two in combination in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Eng J Med* 2004; 351: 1206-17.
- 77- Hadziyannis SJ, Papatheodoridis GV, Dimou E, Laras A, Papaioannou C. Efficacy of long-term Lamivudine monotherapy in patients with hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology* 2000; 32: 847-51.
- 78- Chang TT, Jia JD, Omata M, Yoon SK. New therapies for chronic hepatitis B infection. *Liver Int* 2006; 26: 30-37.
- 79- Lai CL, Shouval D, Lok AS, Chang TT, Cheinquer H, Goodman Z, DeHertogh D, Wilber R, Zink RC, Cross A, Colonna R, Fernandes L; BEHoLD AI463027 Study Group. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*. 2006; 354: 1011-20.
- 80- Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Levine SM, Pokornowski KA, Walsh AW, Fang J, Yu CF, Zhang S, Mazzucco CE, Eggers B, Hsu M, Plym MJ, Poundstone P, Yang J, Colonna RJ. Two-year assessment of entecavir resistance in Lamivudine-refractory hepatitis B virus patients reveals different clinical outcomes depending on the resistance substitutions present. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51: 902-11.
- 81- Perrillo R, Hann HW, Mutimer D, Willems B, Leung N, Lee WM, Moorat A, Gardner S, Woessner M, Bourne E, Brosgart CL, Schiff E. Adefovir dipivoxil added to ongoing lamivudine in chronic hepatitis B with YMDD mutant hepatitis B virus. *Gastroenterology* 2004; 126: 81-90.
- 82- HBF Drug Watch. Sitio de internet: http://www.hepb.org/professionals/hbf_drug_watch.htm. Acceso 7 de Abril del 2007.
- 83- Lau GK, Suri D, Liang R, Rigopoulou EI, Thomas MG, Mullerova I. Resolution of chronic hepatitis B and anti-HBs seroconversion in humans by adoptive transfer of immunity to hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 2002; 122: 614-24.
- 84- Shouval D, Ilan Y. Transplantation of hepatitis B immune lymphocytes as means for adoptive transfer of immunity to hepatitis B virus. *J Hepatol* 1995; 23: 98-101.
- 85- Webster GJ, Reignat S, Brown D, Ogg GS, Jones L, Seneviratne SL. Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004; 78: 5707-19.
- 86- Jung MC, Hartmann B, Gerlach JT, Diepolder H, Gruber R, Schraut W, Gruner N, Zachoval R, Hoffmann R, Santantonio T, Wachtler M, Pape GR. Virus-specific lymphokine production differs

- quantitatively but not qualitatively in acute and chronic hepatitis B infection. *Virology* 1999; 261: 165-72.
- 87- Penna A, Del Prete G, Cavalli A, Bertoletti A, D'Elis MM, Sorrentino R. Predominant T-helper 1 cytokine profile of hepatitis B virus nucleocapsid-specific T cells in acute self-limited hepatitis B. *Hepatology* 1997; 25: 1022-27.
- 88- Rehermann B, Lau D, Hoofnagle JH, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte responsiveness after resolution of chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Invest* 1996; 97: 1655-65.
- 89- Boni C, Penna A, Ogg GS, Bertoletti A, Pilli M, Cavallo C. Lamivudine treatment can overcome cytotoxic T-cell hyporesponsiveness in chronic hepatitis B: new perspectives for immune therapy. *Hepatology* 2001; 33: 963-71.
- 90- Boni C, Penna A, Bertoletti A, Lamonaca V, Rapti I, Missale G. Transient restoration of anti-viral T cell responses induced by lamivudine therapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2003; 39: 595-605.
- 91- Pol S, Nalpas B, Driss F, Michel ML, Tiollais P, Denis J. Efficacy and limitations of a specific immunotherapy in chronic hepatitis B. *J Hepatol* 2001; 34: 917-21.
- 92- Dikici B, Kalayci AG, Ozgenc F, Bosnak M, Davutoglu M, Ece A. Therapeutic vaccination in the immunotolerant phase of children with chronic hepatitis B infection. *Pediatr Infect Dis J* 2003; 22: 345-49.
- 93- Yalcin K, Acar M, Degerteldn H. Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial. *Infection* 2003; 31: 221-25.
- 94- Dahmen A, Herzog-Hauff S, Bocher WO, Galle PR, Lohr HF. Clinical and immunological efficacy of intradermal vaccine plus lamivudine with or without interleukin-2 in patients with chronic hepatitis B. *J Med Virol* 2002; 66: 452-60.
- 95- Lamivudine and Therapeutic Vaccine Evaluation in Senegalese Patients With Chronic Hepatitis B Infection (ANRS 12100 HEPADAK-2). Sitio de internet: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00120796>. Acceso 8 de Abril del 2007.
- 96- Horiike N, Fazle Akbar SM, Michitaka K, Joukou K, Yamamoto K, Kojima N. by lamivudine: a novel approach for treating patients with chronic hepatitis B. *J Clin Virol* 2005; 32: 156-61.
- 97- Safadi R, Israeli E, Papo O, Shibolet O, Melhem A, Bloch A. Treatment of chronic hepatitis B virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins. *Am J Gastroenterol* 2003; 98: 2505-15.
- 98- Starkel P, Stoffel M, Lerut J, Horsmans Y. Response to an experimental HBV vaccine permits withdrawal of HBIG prophylaxis in fulminant and selected chronic HBV-infected liver graft recipients. *Liver Transpl* 2005; 11: 1228-34.
- 99- Rosenau J, Hooman N, Rifai K, Solga T, Tillmann HL, Grzegowski E, Nashan B, Klempnauer J, Strassburg CP, Wedemeyer H, Manns MP. Hepatitis B virus Immunization with an adjuvant containing vaccine after liver transplantation for hepatitis B-related disease: failure of humoral and cellular immune response. *Transpl Int* 2006; 19: 828-33.
- 100- Rosenau J, Hooman N, Hadem J, Rifai K, Bahr MJ, Philipp G, Tillmann HL, Klempnauer J, Strassburg CP, Manns MP. Failure of hepatitis B vaccination with conventional HBsAg vaccine in patients with continuous HBIG prophylaxis after liver transplantation. *Liver Transpl* 2007; 13: 367-73.
- 101- Chee-Kin H, Lau GKK. Advances in immunomodulating therapy of HBV infection. *Int J Med Sci* 2005; 2: 24-29.
- 102- Yang SH, Lee CG, Park SH, Im SJ, Kim YM, Son JM, Wang JS, Yoon SK, Song MK, Ambrozaitis A, Kharchenko N, Yun YD, Kim CM, Kim CY, Lee SH, Kim BM, Kim WB, Sung YC. Correlation of antiviral T-cell responses with suppression of viral rebound in chronic hepatitis B carriers: a proof-of-concept study. *Gene Ther* 2006; 13: 1110-17.
- 103- Mancini-Bourguine M, Fontaine H, Scott-Algara D, Pol S, Brechot C, Michel ML. Induction or expansion of T-cell responses by a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Hepatology* 2004; 40: 874-82.
- 104- Rottinghaus ST, Poland GA, Jacobson RM, Barr LJ, Roy MJ. Hepatitis B DNA vaccine induces protective antibody responses in human non-responders to conventional vaccination. *Vaccine* 2003; 21: 4604-08.

- 105- Fazle Akbar SM, Abe M, Yoshida O, Murakami H, Onji M. Dendritic cell-based therapy as a multidisciplinary approach to cancer treatment: present limitations and future scopes. *Curr Med Chem* 2006; 13: 3113-19.
- 106- Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-90.
- 107- Vandepapeliere P, Rehermann B, Koutsoukos M, Moris P, Garcon N, Wettendorff M, Leroux-Roels G. Potent enhancement of cellular and humoral immune responses against recombinant hepatitis B antigens using AS02A adjuvant in healthy adults. *Vaccine* 2005; 23: 2591-601.
- 108- Hutchings CL, Gilbert SC, Hill AV, Moore AC. Novel protein and poxvirus-based vaccine combinations for simultaneous induction of humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 2005; 175: 599-606.
- 109- Aguilar JC, Muzio V, Leal MJ, Guillén G, Pentón E, Veliz G, Pichardo D, Herrera A, Cruz LJ, Carmenate T, Mesa C, Hechavarría M, Días M, Madrazo JJ. Formulaciones inmunopotenciadoras para uso vacunal. WO 98/39032. 1998. Aplicación de patente internacional PCT.
- 110- McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL. Intranasal immunization of mice with CpG DNA induces strong systemic and mucosal responses that are influenced by other mucosal adjuvants and antigen distribution. *Mol Med* 2000; 6: 867-77.
- 111- McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL. The potential of oligodeoxynucleotides as mucosal and parenteral adjuvants. *Vaccine* 2001; 19: 2657-60.
- 112- McCluskie MJ, Weeratna RD, Payette PJ, Davis HL. Parenteral and mucosal prime-boost immunization strategies in mice with hepatitis B surface antigen and CpG DNA. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 179-85.
- 113- Baldridge JR, Yorgensen Y, Ward JR, Ulrich JT. Monophosphoryl lipid A enhances mucosal and systemic immunity to vaccine antigens following intranasal administration. *Vaccine* 2000; 18: 2416-25.
- 114- Saraf S, Mishra D, Asthana A, Jain R, Singh S, Jain NK. Lipid microparticles for mucosal immunization against hepatitis B. *Vaccine* 2006; 24: 45-56.
- 115- Jaganathan KS, Vyas SP. Strong systemic and mucosal immune responses to surface-modified PLGA microspheres containing recombinant hepatitis B antigen administered intranasally. *Vaccine* 2006; 24: 4201-11.
- 116- Investigadores de la USC lideran el proyecto de una vacuna vía nasal contra la hepatitis B para el Tercer Mundo. Sitio de Internet: <http://www.solociencia.com/noticias/0507/06150213.html>. Acceso 7 de Abril del 2007.
- 117- Castro FO, Pérez A, Aguilar A, De la Riva G, Martínez R, De la Fuente J, Herrera L. Expresión del gen del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B en ratones transgénicos. *Interferón y Biotecnología* 1989; 6: 251-257.
- 118- Sambrook J, E.F.Fritsch, T.Maniatis. *Cloning: a laboratory manual (second edition)*., Cold Spring Harbor Laboratory ed. Cold Spring Harbor, New York: 1989.
- 119- Schumann A, Fiedler M, Dahmen U, Grosse-Wilde H, Roggendorf M, Lindemann M. Cellular and humoral immune response to a third generation hepatitis B vaccine. *Journal of Viral Hepatitis* 2007 Online Early Article doi:10.1111/j.1365-2893.2007.00848.x.
- 120- Lorenzo LJ, Duenas-Carrera S, Falcon V, Acosta-Rivero N, Gonzalez E, de la Rosa MC, Menendez I, Morales J. Assembly of truncated HCV core antigen into virus-like particles in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 281: 962-5.
- 121- Houghten RA, DeGraw ST, Bray MK, Hoffmann SR, Frizzell ND. Simultaneous Multiple Peptide Synthesis: The Rapid Preparation of Large Numbers of Discrete Peptides for Biological, Immunological, and Methodological Studies. *Biotechniques* 1986; 4: 522-6.
- 122- Mussacchio A. Plasmidio de expresión correspondiente a la construcción genética pHbCm492. CIGB Know How 2006.
- 123- Palenzuela D. Plasmidio de expresión correspondiente a la construcción genética pHbCIV-2. CIGB Know How 2006.
- 124- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150: 76.

- 125- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
- 126- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680.
- 127- Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook (Review article). *J Immunol Methods* 1984; 72: 313.
- 128- Lorenzo LJ, García O, Acosta-Rivero N, Dueñas-Carreara S, Martínez G, Alvarez-Obregón JC, Pichardo D, Ramos A, Guerra I, Morales J. Expression and immunological evaluation of the *Escherichia Coli*-derived hepatitis C virus envelope E1 protein. *Biotechnol Appl Biochem* 2000; 32: 137-43.
- 129- Cruz LJ, Iglesias E, Aguilar JC, Cabrales A, Reyes O, Andreu D. Different immune response of mice immunized with conjugates containing multiple copies of either consensus or mixotope versions of the V3 loop peptide from human immunodeficiency virus type 1. *Bioconjug Chem* 2004; 15: 1110-7.
- 130- Zuckerman A. Viral hepatitis and test for the Australia (hepatitis-associated) antigen and antibody. *Bull WHO* 1970; 42: 975-92.
- 131- Cruz LJ, Iglesias E, Aguilar JC, Gonzalez LJ, Reyes O, Albericio F, Andreu D. A comparative study of different presentation strategies for an HIV peptide immunogen. *Bioconjug Chem*. 2004; 15: 112-20.
- 132- Alvarez-Obregon JC, Duenas-Carrera S, Valenzuela C, Grillo JM. A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. *Vaccine* 2001; 19: 3940-6.
- 133- Sun Y, Iglesias E, Samri A, Kamkamidze G, Decoville T, Carcelain G, Autran B. A systematic comparison of methods to measure HIV-1 specific CD8 T cells. *J Immunol Methods*. 2003; 272: 23-34.
- 134- Bright RA, Carter DM, Daniluk S, Toapanta FR, Ahmad A, Gavrilov V, Massare M, Pushko P, Mytle N, Rowe T, Smith G, Ross TM. Influenza virus-like particles elicit broader immune responses than whole virion inactivated influenza virus or recombinant hemagglutinin. *Vaccine*. 2007; 25: 3871-8.
- 135- Pinto LA, Castle PE, Roden RB, Harro CD, Lowy DR, Schiller JT, Wallace D, Williams M, Kopp W, Frazer IH, Berzofsky JA, Hildesheim A. HPV-16 L1 VLP vaccine elicits a broad-spectrum of cytokine responses in whole blood. *Vaccine*. 2005; 23: 3555-64.
- 136- Denis J, Majeau N, Acosta-Ramirez E, Savard C, Bedard MC, Simard S, Lecours K, Bolduc M, Pare C, Willems B, Shoukry N, Tessier P, Lacasse P, Lamarre A, Lapointe R, Lopez Macias C, Leclerc D. Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization. *Virology* 2007; 363: 59-68.
- 137- Buonaguro L, Tornesello ML, Tagliamonte M, Gallo RC, Wang LX, Kamin-Lewis R, Abdelwahab S, Lewis GK, Buonaguro FM. Baculovirus-derived human immunodeficiency virus type 1 virus-like particles activate dendritic cells and induce ex vivo T-cell responses. *J Virol* 2006; 80: 9134-43.
- 138- Ye L, Lin J, Sun Y, Bennouna S, Lo M, Wu Q, Bu Z, Pulendran B, Compans RW, Yang C. Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology* 2006; 351: 260-70.
- 139- Steven AC, Conway JF, Cheng N, Watts NR, Belnap DM, Harris A, Stahl SJ, Wingfield PT. Structure, assembly, and antigenicity of hepatitis B virus capsid proteins. *Adv Virus Res*. 2005; 64: 125-64.
- 140- Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y, Furutani Y, Yano O, Kataoka T, Sudo T, et al. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium Boris BCG*. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Natl Cancer Inst*. 1984 Apr;72(4):955-62.
- 141- Birnbaum, F. and Nassal, M., Hepatitis B virus nucleocapsid assembly: primary structure requirements in the core protein. *J Virol* 1990; 64: 3319-3330.
- 142- Huang CF, Lin SS, Ho YC, Chen FL, Yang CC. The immune response induced by hepatitis B virus principal antigens. *Cell Mol Immunol* 2006; 3: 97-106.
- 143- Macpherson AJ, Uhr T. Compartmentalization of the mucosal immune responses to commensal intestinal bacteria. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Dec;1029:36-43.

- 144- Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005; 206: 32-63.
- 145- Cronkhite RI, Michael JG. Sub-compartmentalization of the gastrointestinal (GI) immune system determined with microbeads that differ in release properties. *Vaccine* 2004; 22: 2106-15.
- 146- Matsuura K, Michitaka K, Yamauchi K, Nadano S, Okada S, Matsuura B, Hiasa Y, Horiike N, Onji M. Characteristics of geographic distributions and route of infection for hepatitis B virus genotype D in Ehime area in western Japan. *Hepato Res* 2007; 37: 255-62.
- 147- Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE, Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. *Epidemiol Rev.* 2006; 28: 112-25.
- 148- Rong Q, Huang J, Su E, Li J, Li J, Zhang L, Cao K. Infection of hepatitis B virus in extrahepatic endothelial tissues mediated by endothelial progenitor cells. *Virology* 2007; 4: 36-45.
- 149- del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodriguez T, Gil D, Zayas C, Taboada C, Acevedo R, Perez DR, Perez O. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and proteoliposome as mucosal adjuvants. *Vaccine* 2006; 24: S2-50-1.
- 150- A Rudin,EL Johansson, C Bergquist, J Holmgren Differential Kinetics and Distribution of Antibodies in Serum and Nasal and Vaginal Secretions after Nasal and Oral Vaccination of Humans. *Infect Immun* 1998; 66: 3390-3396.
- 151- Francis MJ, Hastings GZ, Brown AL, Grace KG, Rowlands DJ, Brown F, Clarke BE. Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 2545-9.
- 152- Billaud JN, Peterson D, Lee BO, Maruyama T, Chen A, Sallberg M, Garduno F, Goldstein P, Hughes J, Jones J, Milich D. Advantages to the use of rodent hepadnavirus core proteins as vaccine platforms. *Vaccine* 2007; 25: 1593-606.
- 153- Hagiwara Y, Kawamura YI, Kataoka K, Rahima B, Jackson RJ, Komase K, Dohi T, Boyaka PN, Takeda Y, Kiyono H, McGhee JR, Fujihashi K. A second generation of double mutant cholera toxin adjuvants: enhanced immunity without intracellular trafficking. *J Immunol* 2006; 177: 3045-54.
- 154- Perez O, Bracho G, Lastre M, Zayas C, Gonzalez D, Gil D, del Campo J, Acevedo R, Taboada C, Rodriguez T, Fajardo ME, Sierra G, Campa C, Mora N, Barbera R, Solis RL. Proteliposome-derived Cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine* 2006; 24:S2-52-3.
- 155- Liu X, Siegrist S, Amacker M, Zurbriggen R, Pluschke G, Seeberger PH. Enhancement of the immunogenicity of synthetic carbohydrates by conjugation to virosomes: a leishmaniasis vaccine candidate. *ACS Chem Biol* 2006; 1 :161-4.
- 156- Westerfeld N, Pluschke G, Zurbriggen R. Optimized Malaria-antigens delivered by immunostimulating reconstituted influenza virosomes. *Wien Klin Wochenschr* 2006; 118: 50-57.
- 157- Netter HJ, Macnaughton TB, Woo WP, Tindle R, Gowans EJ. Antigenicity and immunogenicity of novel chimeric hepatitis B surface antigen particles with exposed hepatitis C virus epitopes. *J Virol* 2001; 75: 2130-41.
- 158- Nawar HF, Arce S, Russell MW, Connell TD. Mutants of type II heat-labile enterotoxin LT-IIa with altered ganglioside-binding activities and diminished toxicity are potent mucosal adjuvants. *Infect Immun.* 2007; 75: 621-33.
- 159- Belnap DM, Watts NR, Conway JF, Cheng N, Stahl SJ, Wingfield PT, Steven AC. Diversity of core antigen epitopes of hepatitis B virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 10884-10889.
- 160- Floreani A, Baldo V, Cristofolletti M, Renzulli G, Valeri A, Zanetti C, Trivello R. Long-term persistence of anti-HBs after vaccination against HBV: an 18 year experience in health care workers. *Vaccine* 2004; 22: 607-10.
- 161- Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, Krieg AM, Cameron DW. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS.* 2005; 19: 1473-9.
- 162- Tleugabulova D, Falcon V, Sewer M, Penton E. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998; 716: 209-19.
- 163- Tan WS. Inhibition of hepatitis B virus assembly with synthetic peptides derived from the viral surface and core antigens. *J Gen Appl Microbiol* 2002; 48: 103-7.
- 164- Wikman M, Friedman M, Pinitkiatisakul S, Hemphill A, Lovgren-Bengtsson K, Lunden A, Stahl S. Applying biotin-streptavidin binding for iscom (immunostimulating complex)association of recombinant immunogens. *Biotechnol Appl Biochem* 2005; 41: 163-74.

- 165- Hasebe A, Akbar SM, Furukawa S, Horiike N, Onji M. Impaired functional capacities of liver dendritic cells from murine hepatitis B virus (HBV) carriers: relevance to low HBV-specific immune responses. *Clin Exp Immunol* 2005; 139: 35-42.
- 166- Miller H, Zhang J, Kuolee R, Patel GB, Chen W. Intestinal M cells: the fallible sentinels? *World J Gastroenterol* 2007; 13: 1477-86.
- 167- Couch RB. Nasal vaccination, Escherichia coli enterotoxin, and Bell's palsy. *N Engl J Med* 2004; 350: 860-1.
- 168- Sonveaux N, Thines D, Ruyschaert JM. Characterization of the HBsAg particle lipid membrane. *Res Virol* 1995; 146 :43-51.
- 169- Aguilar A, Muzio V, Guillen G, Aguilar JC. Estudio clínico Fase I, controlado, aleatorizado y a doble ciegas de la formulación del HBsAg y el polisacárido Acemanano. 2007. En preparación.
- 170- de Swart RL, LiCalsi C, Quirk AV, van Amerongen G, Nodelman V, Alcock R, Yuksel S, Ward GH, Hardy JG, Vos H, Witham CL, Grainger CI, Kuiken T, Greenspan BJ, Gard TG, Osterhaus AD. Measles vaccination of macaques by dry powder inhalation. *Vaccine* 2007; 25: 1183-90.
- 171- Djupesland PG, Skretting A, Winderen M, Holand T. Breath actuated device improves delivery to target sites beyond the nasal valve. *Laryngoscope* 2006; 116: 466-72.
- 172- Akbar SM, Horiike N, Onji M. Immune therapy including dendritic cell based therapy in chronic hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*. 2006; 12: 2876-83.
- 173- Makitalo B, Lundholm P, Hinkula J, Nilsson C, Karlen K, Morner A, Sutter G, Erfle V, Heeney JL, Wahren B, Biberfeld G, Thorstensson R. Enhanced cellular immunity and systemic control of SHIV infection by combined parenteral and mucosal administration of a DNA prime MVA boost vaccine regimen. *J Gen Virol* 2004; 85: 2407-19.
- 174- Vajdy M, Baudner B, Del Giudice G, O'Hagan D. A vaccination strategy to enhance mucosal and systemic antibody and T cell responses against influenza. *Clin Immunol* 2007; 123: 166-75.
- 175- Zhevachevsky NG, Nomokonova NY, Beklemishev AB, Belov GF. Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: diagnostic and epidemiological significance. *J Med Virol* 2000; 61: 433-8.
- 176- Reignat S, Webster GJ, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, Dusheiko G, Williams R, Maini MK, Bertoletti A. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med* 2002; 195: 1089-101.
- 177- Chabot S, Wagner JS, Farrant S, Neutra MR. TLRs regulate the gatekeeping functions of the intestinal follicle-associated epithelium. *J Immunol*. 2006; 176: 4275-83.
- 178- Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, van der Laan LJ, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*. 2005; 41: 771-8.
- 179- Wang K, Fan X, Fan Y, Wang B, Han L, Hou Y. Study on the function of circulating plasmacytoid dendritic cells in the immunoactive phase of patients with chronic genotype B and C HBV infection. *J Viral Hepat*. 2007; 14: 276-82.
- 180- Boni C, Fiscaro P, Valdatta C, Amadei B, Di Vincenzo P, Giuberti T, Laccabue D, Zerbini A, Cavalli A, Missale G, Bertoletti A, Ferrari C. Characterization of hepatitis B virus (HBV)-specific T-cell dysfunction in chronic HBV infection. *J Virol* 2007; 81: 4215-25.
- 181- Gehring AJ, Sun D, Kennedy PT, Nolte-t Hoen E, Lim SG, Wasser S, Selden C, Maini MK, Davis DM, Nassal M, Bertoletti A. The level of viral antigen presented by hepatocytes influences CD8 T-cell function. *J Virol* 2007; 81: 2940-9.
- 182- Bocharov G, Ludewig B, Bertoletti A, Klenerman P, Junt T, Krebs P, Luzyanina T, Fraser C, Anderson RM. Underwhelming the immune response: effect of slow virus growth on CD8+-T-lymphocyte responses. *J Virol*. 2004; 78: 2247-54.
- 183- Zheng BJ, Zhou J, Qu D, Siu KL, Lam TW, Lo HY, Lee SS, Wen YM. Selective functional deficit in dendritic cell--T cell interaction is a crucial mechanism in chronic hepatitis B virus infection. *J Viral Hepat*. 2004; 11: 217-24.
- 184- Beckebaum S, Cicinnati VR, Zhang X, Ferencik S, Frilling A, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G. Hepatitis B virus-induced defect of monocyte-derived dendritic cells leads to impaired T helper type 1 response in vitro: mechanisms for viral immune escape. *Immunology* 2003; 109: 487-95.

- 185- Yao X, Zheng B, Zhou J, Xu DZ, Zhao K, Sun SH, Yuan ZH, Wen YM. Therapeutic effect of hepatitis B surface antigen-antibody complex is associated with cytolytic and non-cytolytic immune responses in hepatitis B patients. *Vaccine* 2007; 25: 1771-9.
- 186- Im SJ, Sung YC. Action mechanism in immunopathogenesis and clearance of HBV. *Korean J Hepatol* 2006; 12: 154-62.
- 187- Thimme R, Wieland S, Steiger C, Ghayeb J, Reimann KA, Purcell RH, Chisari FV. CD8(+) T cells mediate viral clearance and disease pathogenesis during acute hepatitis B virus infection. *J Virol* 2003; 77: 68-76.
- 188- Iglesias E, Franch O, Carrazana Y, Lobaina Y, Garcia D, Sanchez J, Garcia J, Urquiza D, Muzio V, Guillen G, Aguilar JC. Influence of aluminum-based adjuvant on the immune response to multiantigenic formulation. *Viral Immunol* 2006; 19: 712-21.
- 189- Iglesias E, Thompson R, Carrazana Y, Lobaina Y, Garcia D, Sanchez J, Garcia J, Cruz O, Brown E, Martin A, Muzio VL, Aguilar JC. Coinoculation with hepatitis B surface and core antigen promotes a Th1 immune response to a multiepitopic protein of HIV-1. *Immunol Cell Biol*. 2006; 84: 174-83.
- 190- Wang HC, Huang W, Lai MD, Su IJ. Hepatitis B virus pre-S mutants, endoplasmic reticulum stress and hepatocarcinogenesis. *Cancer Sci* 2006; 97: 683-8.
- 191- Zi XY, Yao YC, Zhu HY, Xiong J, Wu XJ, Zhang N, Ba Y, Li WL, Wang XM, Li JX, Yu HY, Ye XT, Lau JT, Hu YP. Long-term persistence of hepatitis B surface antigen and antibody induced by DNA-mediated immunization results in liver and kidney lesions in mice. *Eur J Immunol*. 2006; 36: 875-86.
- 192- Huang Y, Chen Z, Jia H, Wu W, Zhong S, Zhou C. Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg. *Clin Immunol* 2006; 119: 280-90.
- 193- Meuleman P, Libbrecht L, Wieland S, De Vos R, Habib N, Kramvis A, Roskams T, Leroux-Roels G. Immune suppression uncovers endogenous cytopathic effects of the hepatitis B virus. *J Virol*. 2006; 80: 2797-807.
- 194- Akbar SM, Kajino K, Tanimoto K, Kurose K, Masumoto T, Michitaka K, Horiike N, Onji M. Placebo-controlled trial of vaccination with hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus transgenic mice. *J Hepatol*. 1997; 26: 131-7.
- 195- Akbar SM, Onji M, Inaba K, Yamamura K, Ohta Y. Low responsiveness of hepatitis B virus-transgenic mice in antibody response to T-cell-dependent antigen: defect in antigen-presenting activity of dendritic cells. *Immunology* 1993; 78: 468-75.
- 196- Schmidt CS, Morrow WJ, Sheikh NA. Smart adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6: 391-400.
- 197- Mancini-Bourguine M, Fontaine H, Brechot C, Pol S, Michel ML. Immunogenicity of a hepatitis B DNA vaccine administered to chronic HBV carriers. *Vaccine* 2006; 24: 4482-4489.
- 198- Sprengers D, Janssen HL. Immunomodulatory therapy for chronic hepatitis B virus infection. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005; 19: 17-26.
- 199- Chen M, Li YG, Zhang DZ, Wang ZY, Zeng WQ, Shi XF, Guo Y, Guo SH, Ren H. Therapeutic effect of autologous dendritic cell vaccine on patients with chronic hepatitis B: a clinical study. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1806-8.
- 200- Rigopoulou EI, Suri D, Chokshi S, Mullerova I, Rice S, Tedder RS, Williams R, Naoumov NV. Lamivudine plus interleukin-12 combination therapy in chronic hepatitis B: antiviral and immunological activity. *Hepatology* 2005; 42: 1028-36.
- 201- Michel ML, Mancini-Bourguine M. Therapeutic vaccination against chronic hepatitis B virus infection. *J Clin Virol* 2005; 34: S108-S114.

10 AUTOBIBLIOGRAFIA

ARTICULOS PUBLICADOS

Relacionados con la tesis

1. Aguilar JC, Lobaina Y, Muzio V, Garcia D, Penton E, Iglesias E, Pichardo D, Urquiza D, Rodriguez D, Silva D, Petrovsky N, Guillen G. Development of a nasal vaccine for chronic hepatitis B infection that uses the ability of hepatitis B core antigen to stimulate a strong Th1 response against hepatitis B surface antigen. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82: 539-46.
2. Aguilar JC, Acosta-Rivero N, Duenas-Carrera S, Morales Grillo J, Pichardo D, Urquiza D, Guillen G, Muzio V. HCV core protein modulates the immune response against the HBV surface antigen in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 310: 59-63.
3. Lobaina Y*, Palenzuela D, Garcia D, Rodriguez D, Pichardo D, Muzio V, Aguilar JC*. Comparative study of the immunogenicity and immunoenhancing effects of two hepatitis B core antigen variants in mice by nasal administration. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 2: S2-58-9. * *Igual contribución.*
4. Iglesias E*, Thompson R, Carrazana Y, Lobaina Y, Garcia D, Sanchez J, Garcia J, Cruz O, Brown E, Martin A, Muzio VL, Aguilar JC*. Coinoculation with hepatitis B surface and core antigen promotes a Th1 immune response to a multi-epitopic protein of HIV-1. *Immunol Cell Biol.* 2006 Apr;84(2):174-83. * *Igual contribución.*
5. Lobaina Y*, Palenzuela D, Pichardo D, Muzio V, Guillen G, Aguilar JC*. Immunological characterization of two hepatitis B core antigen variants and their immunoenhancing effect on co-delivered hepatitis B surface antigen. *Mol Immunol.* 2005; 42: 289-94. * *Igual contribución.*
6. Aguilar JC*, Rodriguez EG*. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine* 2007; 25: 3752-62. Review * *Igual contribución.*
7. Aguilar JC* Petrovsky N.* Adjuvants. Current state and future trends. *Immunol Cell Biol.* 2004; 82: 488-96. Review * *Igual contribución.*
8. Aguilar JC*, Leal MJ* Vaccine Adjuvants: current state and new trends. *Biotecnología Aplicada* 2000, 17; 3: 5-12. Review. * *Igual contribución.*
9. Aguilar A, González CA, Cinza Z, Cabrera J, Veliz G, Moreno SR, Alemán R, Alonso M, Figueroa N, Díaz PA, Olivera L, Correa A, Lobaina Y, Muzio V, Guillén G, Aguilar JC. Phase I clinical trial in healthy adults of a nasal vaccine candidate containing recombinant hepatitis B surface and core antigens. *Int J Infect Dis.* 2007, 11: 394-401.

PATENTES PUBLICADAS

Relacionadas con la tesis

1. Aguilar JC, Pichardo D, Muzio V, Guillén G, Veliz G, Leal MJ, Pentón E. Formulations containing virus-like particles as immunopotentiators administered through the mucosa. 2000. WO 2000/32229

2. Aguilar JC, Pentón E, Tegabuloba D, Sewer M, Muzio V, Guillén G, Cruz LJ.. Method to obtain vaccine compositions containing HBsAg aggregated structures. 2001, WO 2002/43756 A2
3. Aguilar JC, Alemán R. Guillén G. Muzio V. Formulations containing HBsAg as a nasal immunopotentiator. 2003. WO 03/061692
4. Aguilar JC. Muzio V, Guillén G., Pentón E, *et al.* Pharmaceutical compositions for therapeutic use. 2005. WO 05/037311

PUBLICACIONES

No relacionadas con la tesis

1. Muñoz, E., Aguilar JC et al. Characterization of Capsular Polysaccharides and other biopolymers by low and high resolution chromatography and spectrophotometry. *Acta Chromatographica*, No 7, 1997.
2. Luis J. Cruz*, Enrique Iglesias*, Julio C. Aguilar*, Diogenes Quintana, Hilda E. Garay, Carlos Duarte and Osvaldo Reyes. Study of different coupling agents in the conjugation of a V3-based synthetic MAP to carrier proteins. *Journal of Peptide Science* 7:511. 2001. *same contribution.
3. LJ. Cruz, Rubén Padrón, Luis J. González, Julio C. Aguilar, Enrique Iglesias, Hilda E. Garay, Viviana Falcón, Eulises Rodríguez and Osvaldo Reyes. Peptide synthesis containing a B-cell and a T-cell epitope on dextran beads and evaluation of humoral response against bead-peptide construct. *Letter in Peptide Science* 7:229 . 2000.
4. Acosta-Rivero N, Aguilar JC, Musacchio A, Falcon V, Vina A, de la Rosa MC, Morales J. Characterization of the HCV core virus-like particles produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;287(1):122-125.
5. Cruz LJ*, Iglesias E*, Aguilar JC*, Quintana D, Garay HE, Duarte C, Reyes O. Study of different coupling agents in the conjugation of a V3-based synthetic MAP to carrier proteins. *J Pept Sci*. 2001 Sep;7(9):511-8. * Same contribution
6. Cruz LJ*, Iglesias E*, Aguilar JC*, Gonzalez LJ, Reyes O, Albericio F, Andreu D. A comparative study of different presentation strategies for an HIV peptide immunogen. *Bioconjug Chem*. 2004 Jan-Feb;15(1):112-20. *same contribution
7. Cruz LJ*, Iglesias E*, Aguilar JC*, Cabrales A, Reyes O, Andreu D. Different immune response of mice immunized with conjugates containing multiple copies of either consensus or mixotope versions of the V3 loop peptide from human immunodeficiency virus type 1. *Bioconjug Chem*. 2004 Sep-Oct;15(5):1110-7. * Same contribution
8. Iglesias E*, Aguilar JC*, Cruz LJ*, Reyes O. Broader cross-reactivity after conjugation of V3 based multiple antigen peptides to HBsAg. *Mol Immunol*. 2005 Jan;42(1):99-104. *Same contribution.

9. Acosta-Rivero N, Rodriguez A, Mussachio A, Poutu J, Falcon V, Torres D, Aguilar JC, Linares M, Alonso M, Perez A, Menendez I, Morales-Grillo J, Marquez G, Duenas-Carrera S. A C-terminal truncated hepatitis C virus core protein variant assembles in vitro into virus-like particles in the absence of structured nucleic acids. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 2;334(3):901-6.
10. Iglesias E*, Franch O, Carrazana Y, Lobaina Y, Garcia D, Sanchez J, Garcia J, Urquiza D, Muzio V, Guillen G, Aguilar JC.* Influence of aluminum-based adjuvant on the immune response to multiantigenic formulation. *Viral Immunol.* 2006 Winter;19(4):712-21. * Same contrib..

PATENTES PUBLICADAS

No relacionadas con la tesis

1. Aguilar JC, Muzio V, Guillén G, Veliz G, Pichardo D, Leal MJ, Pentón E *et al.* Immunopotentiating formulations for vaccinal use. 1998. WO 1998/39032
2. Aguilar JC, Muzio V, Guillén G, Veliz G, Leal MJ, Herrera A, Quinatana D, Mussachio A, Pichardo D, Pentón E *et al.* Formulations containing nucleic acids and acemannan. 2000. WO 2000/13704.
3. Aguilar JC*; Iglesias E*; Cruz, LJ*; Muzio, V; Reyes O; Garay, H; Pentón E; Guillén G. 2001. Method to obtain new antigenic structures with high crossreactivity and resulting formulations. 2002. WO 2002/36160 A2
4. Oil based formulations based on Jojoba Bean Oil. Guillen G, Aguilar JC. Muzio V. Pentón E. *et al.* presented in April 2004 in Cuba *et al.* WO 2005/072679
5. Aguilar JC, Pentón E, Guillén G, Muzio V, González S, Ubieta R Herrera L. Formulaciones terapéuticas combinadas. Presentación Nacional Febrero, 2007.