



Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana

**Obtención del cocleato derivado del proteoliposoma de
Neisseria meningitidis B por filtración tangencial y
evaluación de su capacidad adyuvante**

TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

Autora: Ing. Caridad Zayas Vignier

La Habana

2014



Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana

**Obtención del cocleato derivado del proteoliposoma de
Neisseria meningitidis B por filtración tangencial y
evaluación de su capacidad adyuvante**

TESIS EN OPCIÓN AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

Autora: Ing. Caridad Zayas Vignier

Tutores: Dr. Oliver G. Pérez Martín, Dr. C.

Lic. Gustavo R. Bracho Granado, Dr. C.

Asesor: Dr. Juan F. Infante Bourzac, Dr. C.

La Habana

2014

SÍNTESIS

El desarrollo de nuevos adyuvantes vacunales es un tema importante en las investigaciones actuales. En Instituto Finlay, se ha obtenido el AFCo 1 (Adyuvante Finlay Cocleato 1), derivado del proteoliposoma (PL) de *Neisseria meningitidis* B, el cual puede ser administrado por vía parenteral y mucosal, luego de ser desarrollado mediante diálisis. El objetivo del presente trabajo fue obtener a escala piloto el AFCo1 mediante filtración tangencial (FT), lo cual permitió un fácil escalado y la confección de lotes de manera aséptica, conservando sus propiedades como adyuvante. El PL (material de partida) se resuspendió en una solución tampón que contenía Desoxicolato de Sodio transformándose en AFCo1, mediante la adición de calcio. La adición del calcio y la remoción del detergente se realizó a través de FT en cartuchos de fibra hueca, a volumen constante. Los lotes obtenidos resultaron ser estables y no tóxico en las condiciones de estudios evaluadas. La inmunización por vía intranasal de ratones BALB/c con AFCo1 indujo respuestas específicas de anticuerpos IgA en saliva e IgG en el suero; se demostró además, la inducción de un patrón de respuesta Th1, a partir de la estimulación de IgG2a, Interferón γ , y no de IL-5. Se demostró también, la acción adyuvante sobre antígenos del propio PL y sobre antígenos no relacionados con este como la ovalbúmina bovina, un péptido sintético de *Streptococo* β hemolítico y una proteína recombinante de este patógeno, los cuales se adyuvaron y se administraron por vía intranasal.

TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Ag	Antígeno
ACF	Adyuvante Completo de Freund
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFCo1	Adyuvante Finlay Cocleato 1
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund
ARM	Agencias Regulatorias Mundiales
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
CD(i ó m)	Células dendríticas (i, inmadura y m, madura)
CDC	Centro para el Control de Enfermedades, del inglés Center for Disease Control
CECMED	Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos
CENPALAB	Centro para la Producción de Animales de Laboratorio
CG	Cromatografía Gaseosa
Co	Cocleato
CPA	Células presentadoras de antígenos
DO	Densidad óptica
ELISA	Inmunoensayo de enzima unida, del inglés “Enzyme-linked immunosorbent assay”
EM	Espectrometría de masas
Flps	Fosfolípidos
FT	Filtración tangencial
IE	Índice de estimulación
IFA	Ingrediente farmacéutico activo
IFN α, β ó γ	Interferón alfa, beta o gamma
IgA, IgE, IgG	Inmunoglobulinas de clase A, E y G
IgGn	Subclase de Inmunoglobulina G (1, 2, 2a, 3 ó 4)
IL-n	Interleucina (1, 2, 4, 6, 12 ó 18)
IM	Intramuscular
IN	Intranasal
ISCOM	Complejo inmune estimulante del inglés “Immune stimulating complexes”
ISS	Secuencias inmunoestimuladoras, del inglés “Immunostimulatory sequences”
LϕT	Linfocito T
LϕTc	Linfocitos T citotóxicos
LPS	Lipopolisacáridos
MΦ	Macrófago
MPLA	Monofosforil lípido A (MPL (3-O-desacil-4 monofosforil lípido))
MSTFA	Ioduro de amonio: Mercaptoetanol
Ova	Ovoalbúmina

TABLA DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

PAMPs	Del inglés “Pathogen Associated Molecular Patterns”, Patrones moleculares asociados a patógenos
PL	Proteoliposoma de la membrana externa
PLG	Polilactíl co-glicolato
PM	Peso molecular
Por	Porinas
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones, del inglés “Pattern Recognition Receptors”
RRR	Refinamiento, reemplazo y reducción
SA	Sistema Adyuvante
SDS	Sodio dodecil sulfato
SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida con SDS y condiciones reductoras, del inglés “Poliacrilamid gel electrophoresis with SDS”
SLD	Sistemas de liberación de drogas
SSTF	Solución salina tamponada
STS	Solución tampón sustrato
MFTG	Medio fluido de Tioglicolato
TA	Temperatura ambiente
TC	Toxina de <i>Vibrio cholerae</i>
TLAN	Tejido linfoide asociado a la Nesofaringe
Thn	Linfocito T CD4 ⁺ auxiliador de tipo 1, 2 ó 3
TNF-α, β	Factor de necrosis tumoral (α y β)
TTLE	Toxina termolábil de <i>Echerichia coli</i>
UA	Unidades arbitrarias
VLP	Partículas similares a virus, del inglés Virus-like particle
VSSP	Proteoliposoma de talla muy pequeña, del inglés “very small size proteoliposomes”
Pa	Presión de alimentación
Pr	Presión de retenido
Pf	Presión de filtrado
PTM	Presión transmembranal
RDR	Rango dinámico rápido
RDL	Rango dinámico lento
PsEE	Pseudo estado estacionario

Tabla de Contenido

I.	INTRODUCCION	1
II.	REVISION BIBLIOGRAFICA	9
	II.1 <i>Neisseria meningitidis</i>	9
	II.2 Adyuvantes. Mecanismo de acción.	11
	II.2.1 Adyuvantes mucosales	12
	II.3 Cocleatos	13
	II.3.1 Cocleatos derivados de proteoliposomas bacterianos	14
	II.3.2 Métodos para la obtención de cocleatos.	16
	II.3.3 Filtración tangencial (FT).....	17
	II.4 Estabilidad y ensayos de seguridad de adyuvantes	20
III.	MATERIALES Y METODOS	26
	III.1 Obtención de AFCo1 a partir de proteoliposoma de <i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B por filtración tangencial	26
	III.1.1 Obtención del proteoliposoma de <i>Neisseria meningitidis</i> serogrupo B	26
	III.1.2 Determinación de las condiciones óptimas para la formación del AFCo1 por filtración tangencial	26
	III.1.3 Filtración tangencial con fibra hueca	27
	III.2 Evaluación del proceso	27
	III.2.1 Cuantificación de proteínas.....	27
	III.2.2 Cuantificación de fosfolípidos	28
	III.2.3 Determinación de la eficiencia de incorporación de los principales componentes del PL en el AFCo1	29
	III.2.4 Determinación de Desoxicolato de Sodio residual, por cromatografía gaseosa.....	29
	III.3 Caracterización morfológica e inmunoquímica del AFCo1 obtenido por filtración tangencial con fibra hueca	30
	III.3.1 Microscopía óptica.....	30
	III.3.2 Microscopía electrónica de barrido.....	31
	III.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida	31
	III.3.4 Inmunotransferencia	31
	III.4 Animales de experimentación	32
	III.4.1 Inmunización	33
	III.4.2 Toma de muestra.....	34
	III.4.3 Extracción y estimulación de células de bazo.....	34
	III.5 Evaluación de la inmunogenicidad	35
	III.5.1 ELISA de IgG anti proteoliposoma en suero	36
	III.5.2. ELISA de IgA anti proteoliposoma en saliva	37
	III.5.3 Determinación de subclases de IgG1 e IgG2a anti-proteoliposoma	37
	III.5.4 Determinación de IFN γ e IL-5 por ELISA.....	38
	III.5.5 Prueba de hipersensibilidad retardada.....	39

III.6. Diseño general del estudio preliminar de estabilidad de los cocleatos obtenidos mediante FT.....	39
III.6.1 Determinación del tamaño de partícula de los cocleatos	40
III.6.2 Morfología	40
III.6.3 Determinación de pH	41
III.6.4 Determinación de la apariencia.....	41
III.6.5 Determinación de la concentración de Ca ²⁺	41
III.6.6 Determinación de la concentración de proteínas.....	42
III.6.7 Cuantificación del preservo	42
III.6.8 Comprobación de la identidad	42
III.6.9 Límite microbiano.....	42
III.6.10 Determinación de efectividad del preservo	43
III.6.11 Determinación de IgG anti-Proteoliposoma en suero	44
III.7 Estudios de toxicidad.....	44
III.7.1. Ensayos de tolerancia local	44
III.7.2 Estudios de toxicidad por dosis única y por dosis repetida.....	46
III.7.2.1 Diseño del estudio de toxicidad por dosis única	46
III.7.2.2 Estudio de toxicidad por dosis repetida	46
III.8 Determinación de la capacidad adyuvante del AFCo1 frente antígenos no relacionados conel PL	47
III.8.1 AFCo1+Ovalbúmina bovina	48
III.8.2 AFCo1+PepVac TB1 o TB1r.....	48
III.8.3 Toma de muestra.....	49
III.8.4 Determinación de IgG (en suero) e IgA (en saliva) de ratón	49
III.8.5 Determinación de subclase de IgG anti-OVA, anti PepVac TB1 anti y antiTB1r (IgG1 o IgG2a) .	49
III.8.6 Ensayo de inmunidad celular en ratones inmunizados con el péptido sintético PepVacTB1.	50
III.8.7 Determinación de IFN γ , IL-4 e IL-10	51
III.9 Análisis estadístico.....	52
IV. RESULTADOS.....	54
IV.1 Determinación de las condiciones óptimas de Filtración tangencial.....	54
IV.1.1 Comportamiento hidrodinámico	55
IV.2 Caracterización de las estructuras cocleares.....	58
IV.2.1 Determinación de la forma y tamaño de las estructuras cocleares. Microscopía óptica	58
IV.2.2 Microscopía electrónica de barrido.....	59
IV.2.3. Identidad de las estructuras cocleares	59
IV.2.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%.....	59
IV.2.3.2 Inmunotransferencia	60
IV. 3 Inmunogenicidad	61
IV.3.1 Determinación de Ac IgG anti proteoliposoma	61
IV.3.2 Determinación de Ac IgA anti proteoliposoma	62
IV.3.3 Determinación de subclases de IgG anti-proteoliposoma	63
IV.3.4 Determinación de IFN γ e IL-5	64
IV.3.5 Prueba de Hipersensibilidad retardada.....	65
IV.4 Estabilidad preliminar de los cocleatos obtenidos por FT	66
IV 5 Estudios de toxicidad.....	68

TABLA DE CONTENIDO

IV.5.1 Ensayos de tolerancia local.....	68
IV.5.2 Ensayos de toxicidad por dosis única y dosis repetida	72
IV.5.2.1 Estudio anatómo-patológico de toxicidad por dosis única.....	72
IV.5.2.2 Estudio anatómo-patológico de toxicidad por dosis repetida	72
IV.6 Determinación de la capacidad adyuvante del AFCo1 frente antígenos no relacionados con el PL.	73
IV.6.1 Respuestas de IgG anti-OVA, anti PepVac TB1 y anti-TB1r sérica	74
IV.6.2 Respuestas de IgA en saliva anti-OVA, anti PepVac TB1	74
IV.6.3 Determinación de subclase de IgG anti-OVA, anti PepVac TB1 anti y antiTB1r.	75
IV.6.4 Proliferación de linfocitos en ratones BALB/c inmunizados con AFCo1+PepVac TB1.....	76
IV.6.5 Producción de IFN γ , IL-4 e IL10 en ratones BALB/c inmunizados con AFCo1+PepVac TB1.....	77
V. DISCUSIÓN	79
V.1 Consideraciones generales.....	98
VI. CONCLUSIONES.....	99
VII. RECOMENDACIONES	100
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	
IX. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR	
TABLAS Y FIGURAS NO INSERTADAS	
ANEXOS	

I. INTRODUCCION

La introducción de las vacunas en la práctica médica habitual data de principios del siglo XX y tuvo un importante impacto en la salud humana; comparable con el de la introducción de los antibióticos y de las prácticas modernas de higiene (1). En la actualidad se consideran a las vacunas como el método más seguro y eficiente de intervención médica disponible. Sin embargo, hoy en pleno siglo XXI, existe la necesidad de desarrollar nuevas vacunas contra un número importante de enfermedades infecciosas para las cuales estas no se encuentran disponibles aún (1-6) Dentro de este grupo de infecciones emergentes o re-emergentes se encuentran el síndrome respiratorio agudo severo, el Ébola, las infecciones por virus Hanta y virus del Dengue y otras enfermedades (7-15).

Se hace cada vez más necesario, el mejoramiento continuo de vacunas que protejan contra la emergencia de nuevas cepas y que permitan hacer frente al continuo surgimiento de microorganismos resistentes a los medicamentos. Se publican con mayor frecuencia la relación causal de los agentes infecciosos y las enfermedades crónicas no transmisibles como el cáncer, que pueden ser prevenidas o tratadas con una nueva generación de vacunas (2, 7-9, 16-27).

Los adyuvantes han sido cruciales en el desarrollo de las vacunas, y la necesidad actual de nuevos compuestos es mayor que nunca antes, si se tiene en cuenta que la mayoría de las vacunas en desarrollo comprenden antígenos altamente purificados ya sean proteínas o péptidos, que proveen de un perfil de mayor seguridad que el de algunas vacunas de células completas. Sin embargo, la obtención de antígenos puros también ha resultado en una reducción de la inmunogenicidad. En la búsqueda para revertir esta dificultad se han

desarrollado nuevas tecnologías, como las vacunas basadas en vectores vivos y las vacunas de ácido desoxirribonucleico (ADN), pero es el desarrollo de formulaciones adyuvadas, lo que constituye la estrategia preferida para activar los elementos del sistema inmune, necesarios para la protección (3, 7, 8, 12, 28-32).

Los adyuvantes, pueden actuar como inmunopotenciadores, como sistemas de liberación y como polarizadores de la respuesta inmune (33). La mayoría de los inmunopotenciadores derivados de las membranas bacterianas están compuestos por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), cuya identificación por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, “pattern recognition receptors”) en células inmunocompetentes (células dendríticas, macrófagos, etc), inducen un grupo de señales intracelulares que traen como consecuencia la producción de citocinas como el interferón y la inducción de una respuesta inflamatoria y antimicrobiana, asociada con el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa óptima antígeno específica (33). Los sistemas de liberación de antígenos localizan los componentes vacunales y los hacen diana de las células presentadoras de antígenos (CPA), y son generalmente particulados. Algunos adyuvantes, comparten incluso ambos mecanismos de acción (34, 35). La acción polarizadora viene dada por la capacidad del adyuvante de dirigir la respuesta inmune, dígase Th1, Th2, Th17, etc, hacia la estimulación de los mecanismos de protección necesarios contra cada germen (36-40).

La presencia de PAMPs en las membranas bacterianas hace de éstas, una fuente importante de productos con potencialidad adyuvante (41-43). De la membrana externa de *Neisseria meningitidis* del serogrupo B se deriva el proteoliposoma (PL) el cual constituye el antígeno principal de la vacuna cubana VA-MENGOC-BC® contra el

meningococo del serogrupo B (44). El PL es una nanovesícula que contiene varios componentes con diferentes PAMPs en su estructura entre los que se encuentran el lipopolisacárido (LPS) nativo, las porinas y posiblemente trazas de DNA y de peptidoglicano (33, 45-49). Las propiedades inmunogénicas del PL han sido ampliamente estudiadas y se ha demostrado su capacidad de activar un patrón preferencial de respuesta inmune celular Th1 (50-53). Pero a pesar de su potencialidad como adyuvante, su moderada estabilidad en soluciones limita su empleo con este fin en formulaciones vacunales. Teniendo en cuenta estos antecedentes, Mora en el 2001 (54) y Bracho en el 2004 (55), obtuvieron cocleatos derivados de éste PL por diálisis convencional y rotacional, respectivamente. Estos cocleatos son estructuras microtubulares que se denominaron AFCo1 (Adyuvante Finlay cocleato 1) y su obtención se basa en las interacciones entre los componentes proteo-lipídicos del PL con iones Ca^{2+} . La transformación del PL en AFCo1, incrementa la estabilidad de los componentes del PL y le confiere mayor resistencia a sus constituyentes proteicos, lipídicos y otros PAMPs a las condiciones agresivas del ambiente como la temperatura y el pH. El AFCo1 tiene además, una mayor interacción con las células del sistema inmune, convirtiéndolo en un eficiente candidato como adyuvante o vacuna (56). Sin embargo, tanto el proceso de diálisis rotacional, como el de diálisis convencional presentan desventajas como son: el limitado volumen de trabajo, sin posibilidad de escalado, el largo tiempo de procesamiento, el consumo de altos volúmenes de soluciones, el trabajo engorroso y las grandes dificultades para mantener la esterilidad del producto.

En contraste, la filtración tangencial (FT) como método de purificación, es un proceso que se hace cada vez más atractivo para la separación sólidos-líquidos y la realización de cambios de disolventes de una suspensión de partículas (57). Además, en la separación de suspensiones biológicas, ésta ha desplazado los métodos convencionales como la centrifugación y la filtración rotatoria (58). Los procesos de FT en general se sustentan en la utilización de membranas de porosidad controlada, las cuales pueden ser utilizadas para aplicaciones de microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración y osmosis inversa. Hoy en día se le ha dado gran aplicación en procesos de separación y lavado celular; en la eliminación de restos celulares; en la ultrafiltración de proteínas, virus y ADN, en la eliminación de detergentes y en las purificaciones de alta resolución (57)

En el proceso de FT, la existencia de diferentes tipos de membranas según su configuración (plana, fibra hueca, espiral) permite la obtención de un volumen mayor de producto con respecto al proceso de diálisis. La configuración de membrana plana no permite altos recobrados de AFCo1, debido a que la misma se colmata con facilidad, acumulándose el producto en las esquinas y canales del casete, aspecto este último descrito como crítico en esta configuración, lo cuál se demostró por Pérez y cols. (58, 59). Las pérdidas con la configuración de membrana plana pudieran ser minimizadas utilizando otras configuraciones como cartuchos de fibra hueca o en espiral para la obtención del producto a escala piloto, por lo que este trabajo se encaminó a la obtención del AFCo1s por la metodología de FT utilizando cartuchos de fibra hueca y a la demostración de su capacidad adyuvante con relación a los antígenos constituyentes del PL y otros no relacionados con éste, por vía mucosal.

En el proceso de obtención de un adyuvante es de vital importancia caracterizar el mismo con el propósito de determinar su identidad, pureza y potencia. Para ello, debe tenerse en cuenta, la evaluación de diferentes parámetros físico-químicos y biológicos, así como los estudios de estabilidad que permiten identificar las condiciones de almacenamiento adecuadas. Entre los parámetros propuestos para el estudio obtención del adyuvante (AFCo1) por FT con fibra hueca, se encuentran la determinación del tamaño de partícula, morfología, pH, apariencia, concentración de proteínas y del preservo, así como efectividad, identidad, límite microbiano y la inmunogenicidad en suero.

Teniendo en cuenta que se desean obtener estructuras cocleares que pudieran ser administradas por vía nasal, es de vital importancia la garantía de que estas no sean tóxicas en las condiciones ensayadas. Los estudios de toxicología por ende son trascendentales desde el punto de vista de la seguridad de un adyuvante. Numerosos son los ensayos que pueden brindar tal información. La tolerancia local, y la toxicidad a dosis única y repetida, son algunos de los ensayos que pueden ser empleados para este tipo de evaluación.

Se considera también determinante conocer en qué medida el producto obtenido es capaz de conservar las propiedades para lo cual fue diseñado. El desarrollo de nuevas generaciones de vacunas impuso el uso de adyuvantes para potenciar la respuesta de los antígenos solubles y poco inmunogénicos. El AFCo1 contiene varios antígenos propios y la respuesta contra los mismos ha sido ampliamente evaluada en los ensayos experimentales previos a este trabajo con cocleatos obtenidos por dialisis rotacional (49, 55, 60). Se hace cada vez más importante y necesario, tener en cuenta que la acción de

los adyuvantes, puede estar basada en su capacidad de aportar las señales de activación de los linfocitos T (LΦT) para potenciar la respuesta inmune contra antígenos poco inmunogénicos o en su capacidad de generar un ambiente de polarización adecuado para modular el tipo de respuesta inducida (61, 62). Por ello, demostrar que el AFCo1 obtenido por FT con cartucho de fibra hueca es capaz de adyugar además, antígenos no relacionados con el PL tanto inmunogénicos como poco inmunogénicos, resulta esencial.

Entre los poco inmunogénicos, podría emplearse un antígeno modelo como la Ovalbúmina bovina (Ova) y un péptido sintético con epítopes T y B de *Streptococcus* β hemolítico del grupo A (PepVacTB1) y entre los más inmunogénicos pudiera evaluarse, una proteína recombinante que contenga al péptido PepVacTB1.

Entre las diferentes problemáticas que han surgido como puntos críticos de este estudio se encuentran las siguientes:

- 1- ¿Será posible obtener el AFCo1, inmunogénico y con características estructurales y físico-químicas adecuadas, mediante la tecnología de FT a escala piloto?
- 2- ¿Será el AFCo1 obtenido mediante FT, un producto estable en estudios de vida en estante y en condiciones de estrés y no tóxico en las condiciones de ensayo en un modelo murino?
- 3 - ¿Tendrá capacidad adyuvante por vía mucosal el AFCo1 obtenido por FT al formularlo con diferentes antígenos?

Sobre la base de los antecedentes anteriormente descritos y ante la necesidad de establecer una nueva metodología para la obtención del AFCo1, se formuló la siguiente hipótesis:

La transformación del proteoliposoma de *N. meningitidis* serogrupo B en cocleatos, a través de un proceso de filtración tangencial, permitirá obtener estructuras estables y no tóxicas en las condiciones de estudios planteadas, que potenciarán la respuesta inmune de antígenos propios y no relacionados con el proteoliposoma.

A partir de esta hipótesis de trabajo se trazaron los siguientes **objetivos**:

Objetivo general:

Obtener el adyuvante mucosal AFCo1 mediante la tecnología de filtración tangencial estable y no tóxico en modelo murino

Objetivos específicos:

1. Obtener el cocleato a partir de proteoliposomas de *N. meningitidis* serogrupo B mediante la tecnología de filtración tangencial a escala piloto
2. Caracterizar el cocleato obtenido desde el punto de vista físico, químico e inmunológico
3. Realizar estudios preliminares de estabilidad del producto y de toxicidad en murinos
4. Determinar la capacidad adyuvante del AFCo1 con antígenos no relacionados con el PL

Novedad científica e importancia práctica, económica y social de los resultados obtenidos

La novedad científica del presente trabajo consiste en :

- 1- La obtención de AFCo1 mediante la tecnología de Filtración Tangencial empleando la configuración de fibra hueca.

2- La obtención por primera vez, de AFCo1 a escala piloto; estable por 1 año y potencialmente no tóxico.

3- La demostración de la capacidad adyuvante del AFCo1 obtenido, al formularlo con antígenos propios del PL y otros antígenos no relacionados con este, al ser administrado por vía mucosal

La **importancia práctica y económica** radica en la obtención del AFCo1, a partir del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B obtenido a escala piloto en el Instituto Finlay; mediante una tecnología escalable, que no requiere inversiones adicionales a las actuales; que permitirá por tanto el uso del mismo en nuevas formulaciones vacunales; además el proceso de producción es relativamente rápido (48 h) por lo que su producción puede lograrse de forma inmediata.

La **importancia social se basa** en la efectividad del AFCo1 por vía nasal, las vacunas mucosales se preveen como una alternativa a las vacunas parenterales por su bajo costo, mejor aceptación y además por el menor riesgo al no requerir de jeringuillas y agujas, asociadas éstas últimas con el incremento del peligro de infecciones de transmisión parenteral (Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y los virus de hepatitis B y C).

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1 *Neisseria meningitidis*

Neisseria meningitidis es una bacteria patógena gram negativa cuyo único reservorio es el hombre (63) Esta bacteria es el agente etiológico de la Enfermedad Meningocócica, y habita de forma natural en las membranas mucosas de la nasofaringe humana, sin provocar, en la mayoría de los casos, signos clínicos evidentes de infección (63). *N. meningitidis*, se caracteriza estructuralmente por presentar una membrana externa, una cápsula o envoltura y pili o fimbrias con función adherente. Su cápsula posee polisacáridos antigénicos heterogéneos, lo que permite su clasificación en 13 serogrupos designados por las letras A, B, C, D, E, H, I, K, L, W-135, X, Y, Z, los que constituyen uno de los factores más importantes de su virulencia (64). Los serogrupos A, B y C son los causantes de más del 90% de las epidemias de meningitis en el mundo (65). La envoltura celular de *N. meningitidis* vista desde el interior de la bacteria, está formada por una membrana citoplasmática que rodea el citoplasma, una capa de peptidoglicanos y una membrana externa, que consiste en una bicapa fosfolípidos (Flps) y el LPS en la cual están embebidas las proteínas de membrana externa. Las principales proteínas presentes en la membrana externa del meningococo han sido subdivididas en cinco clases estructuralmente diferentes de P1 a P5, relacionadas con su peso molecular (PM) en la migración electroforética (66).

La obtención de vesículas de membrana externa que contienen las principales proteínas del serogrupo B ha sido la estrategia más exitosa hasta el momento en el desarrollo de vacunas contra este serogrupo (44, 67, 68). La membrana externa de *N. meningitidis* B extraída y purificada en forma de vesícula o PL, ha sido utilizada ampliamente como

antígeno principal de la vacuna cubana antimeningocócica VA-MENGOC-BC[®], constituyendo uno de los resultados más relevantes en la protección contra este serogrupo (69). El proceso de obtención del PL incluye su extracción con detergentes, tratamiento enzimático y purificación por centrifugación diferencial y cromatografía. Este PL está constituido fundamentalmente por proteínas mayoritarias de serotipo y subtipo (porinas PorA y PorB) y proteínas de alto PM como P70. Además, contiene fosfolípidos (fosfatidil etanolamina, fosfatidil glicerol, fosfatidil serina y fosfatidil colina) y cantidades controladas de LPS (del 2 a 6% respecto al total de proteínas) (69).

En estudios sobre la respuesta inmune inducida por VA-MENGOC-BC[®], se ha demostrado la capacidad de esta vacuna de inducir anticuerpos con actividad bactericida, proliferación *in vitro* de LΦT, producción de niveles elevados de IFN γ e IL-2 y respuestas positivas de hipersensibilidad retardada tanto en humanos como en modelos animales (50). Se ha demostrado también, la activación de otros mecanismos de tipo celular como la opsonofagocitosis, reclutamiento de macrófagos para la eliminación de las bacterias, así como la participación de radicales reactivos derivados del óxido nítrico (70). Estos resultados sugieren que VA-MENGOC-BC[®] induce una potente respuesta de tipo Th1 de la cual el PL es el responsable directo como componente antigénico principal de esta vacuna.

El PL ha sido empleado en formulaciones contra la alergia, enfermedad que se caracteriza por la inducción de un patrón de respuesta Th2. La mezcla de antígenos del ácaro *Dermatophagoide siboney* con este PL ha logrado revertir el patrón Th2 hacia Th1 (71).

Estructuras derivadas del PL de muy pequeño tamaño, en inglés “very small size proteoliposomes” (VSSP), han sido empleadas en monoterapias anti-tumorales (72). Las VSSP han mostrado su capacidad de aumentar la inmunogenicidad de los gangliósidos altamente tolerados induciendo un patrón de respuesta Th1 (72).

II.2 Adyuvantes. Mecanismo de acción.

Los adyuvantes ayudan a inducir una respuesta inmune temprana, elevada y de larga duración contra el antígeno, lo que permite incluso emplear menores concentraciones del mismo en el preparado vacunal. Los avances en los conocimientos acerca de los mecanismos de la inmunidad innata y el procesamiento y presentación de antígeno han revolucionado la definición tradicional de adyuvante por lo que se distinguen ahora sobre la base de sus mecanismos de acción en dos categorías fundamentales: (i) inmunopotenciadores como los oligonucleótidos de CpG (ODN), toxinas bacterianas y citoquinas y (ii) sistemas de liberación de antígeno como los liposomas y las emulsiones. Mientras los sistemas de liberación de Ag localizan los componentes vacunales y los hacen diana de las células presentadoras de antígenos (CPA), los adyuvantes inmunopotenciadores activan las CPA a través de receptores específicos como los TLR y proveen el contexto inflamatorio necesario para una óptima activación inmune Ag específica (34). Por otro lado, Pérez y cols. (73), adicionan a esta clasificación funcional el término inmunopolarizadores, relacionado con la capacidad de activar durante su proceso de acción, diversas propiedades en diferentes direcciones de la respuesta inmune. Este concepto es esencial para escoger qué adyuvante se necesita para un candidato vacunal particular. Numerosos adyuvantes son capaces de tener funciones duales o solapadas (propiedades como sistema de liberación, inmunoestimulador e

inmunopolarizador); ejemplo de ello son los virosomas, los adyuvantes mucosales de lípidos de arqueobacterias (arqueosomas), los PL y las estructuras cocleares o cocleatos (73,74, 75).

II.2.1 Adyuvantes mucosales

Las estrategias tradicionales de vacunación involucran la inmunización parenteral con inmunógenos inactivados o subunidades de determinantes de virulencia, las cuales confieren protección. Sin embargo, la vacunación mucosal, es capaz de inducir una respuesta inmune patógeno específica local, además de inducir una respuesta inmune sistémica adaptativa. No obstante, en la actualidad hay muy pocas vacunas mucosales aprobadas para su uso en humanos, en general son vacunas orales de microorganismos vivos atenuados. Estas vacunas son altamente eficaces, aunque existe preocupación por su reactogenicidad y de la potencial reversión de su virulencia (76). Recientemente, han sido aprobadas para uso en humanos las vacunas Flumist y Fluenz, contra la influenza (77; 78). Además, en la India se aprobó una vacuna monovalente contra la influenza porcina H1N1 (NASOVAC) (79).

La liberación mucosal del inmunógeno induce una respuesta inmune cualitativamente superior a la respuesta inmune inducida por la vía parenteral. Además, está demostrado que la liberación antigénica mucosal es capaz de inducir tanto la respuesta humoral como celular, a nivel de mucosa y sistémico (80). A pesar de las numerosas ventajas de esta vía, la molécula derivada de la subunidad B de la toxina de cólera es el único adyuvante mucosal aprobado en humanos como parte de la vacuna oral inactivada contra *V. cholerae*, Dukoral (81, 82). Hasta el momento, los estudios en este campo han estado dominados por el uso de sustancias inmunoestimuladoras como la toxina de *V. cholerae*

O1 y la toxina termolábil de *Escherichia coli* (83). Desafortunadamente, ambas toxinas producen reacciones adversas severas en humanos lo que limita su uso como adyuvante (84). Numerosas variantes mutadas de estas toxinas se han obtenido, demostrando ser capaces de potenciar la respuesta de IgAs, anticuerpos séricos e inducir respuesta de linfocito T citotóxicos frente a un grupo de antígenos (85). Sin embargo, los estudios de mutagénesis demuestran una fuerte asociación de la toxicidad con las propiedades adyuvantes (84).

Un gran número de inmunoestimuladores, incluidos los agonistas de los TLR como el CpG oligodeoxinucleótido agonista del TLR9, o el inmunoestimulador no focalizado en TLR como el ligando de las células NKT, α -galactosylceramida, se han probado experimentalmente como adyuvantes mucosales para vacunas contra algunas infecciones mucosales, alcanzándose resultados prometedores. Sin embargo, se hace necesario establecer su eficacia y seguridad en humanos (86, 87). Otros de los adyuvantes mucosales estudiados son las estructuras basadas en lípidos, como los liposomas, los liposomas catiónicos, los PL y cocleatos derivados de PL. Estos últimos pueden incluir moléculas inmunopotenciadoras asociadas al patógeno natural, así como partículas biodegradables y diferentes proteínas de unión a mucosa demostrando su funcionalidad como sistemas de liberación mucosales e inmunopolarizadores con prometedores resultados en la inducción de una inmunidad protectora contra patógenos mucosales (88-90).

II.3 Cocleatos

En 1974, durante estudios de procesos de fusión de vesículas lipídicas en presencia de cationes divalentes como calcio y magnesio, Paphadjopoulos y cols. (91) describieron

por primera vez la formación de un complejo estable, insoluble y multilaminar de cationes y fosfolípidos aniónicos, formado por el enrollamiento en espiral de bicapas lipídicas. En estas estructuras, los cationes divalentes se sitúan entre las bicapas formando un puente iónico, donde las cargas positivas del ión interactúan electrostáticamente con los grupos aniónicos de la cabeza polar de los fosfolípidos de dos membranas adyacentes estabilizando la estructura enrollada (91). Estos autores, utilizaron el término cocleato derivado del griego “*koclíao*” que significa caracol con concha en espiral para identificar las nuevas estructuras originadas (92). Los cocleatos y los liposomas, son estructuras lipídicas que se han utilizado en la investigación y con aplicación en el desarrollo de formulaciones farmacéuticas y la biomedicina, siendo los cocleatos las más estables (93). La fusión de las vesículas, para la formación de los cocleatos, constituye un evento clave que está en estrecha relación con la agregación de estas, el incremento de la permeabilidad de la membrana y el cambio de fase de las cadenas hidrocarbonadas desde el estado líquido-cristalino al estado gel (94). Todos estos eventos se desencadenan de una forma altamente cooperativa con respecto al incremento de la concentración de calcio, el cual neutraliza las cargas negativas de la superficie externa de las vesículas e induce la transición de fase facilitando la agregación. De esta forma, las perturbaciones ocasionadas por los iones calcio sobre las membranas que contienen Flps cargados negativamente y los subsiguientes eventos que se desarrollan, permiten la formación de estructuras cocleares (95).

II.3.1 Cocleatos derivados de proteoliposomas bacterianos

El término proteoliposoma (PL) se utilizó inicialmente para describir estructuras liposomales en las que se incluían proteínas con el objetivo de estudiar las

biomembranas (96). Actualmente, existe toda una rama de la investigación dedicada al estudio y tecnología de liposomas con fines vacunales (97). Sin embargo, las estructuras proteolipídicas con mayor aplicación en el campo de vacunas antibacterianas hasta el momento son las derivadas de microorganismos. Los liposomas son estructuras que poseen una serie de desventajas con respecto a los cocleatos. Los cocleatos, a diferencia de los liposomas, son más resistentes y pueden ser utilizados por vía oral o ser liofilizados sin que se afecte su estructura, además permiten, elevados porcentajes de encapsulación de moléculas con diferentes características físico-químicas (e.j. hidrofóbicas, hidrofílicas, etc.) (93). Por tales razones, han sido considerados para el desarrollo de vacunas y adyuvantes (98). Un acercamiento a este problema, fue realizado por Bracho y cols., y Pérez y cols. (55, 59); quienes obtuvieron cocleatos a partir de proteoliposomas derivados de microorganismos en lugar de utilizar Flps sintéticos y/o comerciales, mediante un proceso de diálisis rotacional continua. El AFCo1 derivado del PL de *N. meningitidis* B fue la primera estructura obtenida con este procedimiento (55, 59).

El AFCo1 obtenido resultó ser una estructura tubular y multilaminar (56), formado por múltiples láminas que se enrolla sobre sí misma como plantea Papahadjopoulos y cols. (92). Los cocleatos derivados de proteoliposomas bacterianos tienen en su composición estructuras muy diferentes (proteínas, LPS, etc) a las descritas en los cocleatos derivados de Flps comerciales o sintéticos, que también pueden agregarse y ensamblarse de distintas maneras, principalmente, cuando se obtienen a partir de cationes diferentes al calcio o mezclas de Flps; dando origen a estructuras multilaminares con formas esféricas y hojas multilaminares planas (99).

El empleo de este método se hizo extensible para la obtención de cocleatos a partir de proteoliposomas derivados de *Vibrio cholerae* O1, el cual se denominó AFCo2 (100, 101).

II.3.2 Métodos para la obtención de cocleatos.

Se han desarrollado múltiples procesos para la obtención de cocleatos de manera que sea posible controlar y modular la talla de la partícula, en concordancia con su actividad biológica (102-104). El método de atrapamiento es uno de ellos. En una primera parte se forman los liposomas a partir de dioleoilfosfatidil serina (DOPS), seguido de la adición controlada de una solución de cloruro de calcio (CaCl_2). En este caso los liposomas pueden formarse a partir de la adición de agua a Flps en polvo o la adición de agua a una película de Flps, esto deriva en la formación de cocleatos y de hojas apiladas (102-104).

Otro método involucra una mezcla inicial de lípidos y detergentes y la diálisis en la cual los cocleatos son obtenidos ya sea por el método de diálisis LC (en el cual se elimina el detergente por diálisis y después se dializa contra una solución de cloruro de calcio) o por el método de diálisis DC (donde en un solo paso el detergente es dializado directamente contra la solución de cloruro de calcio) (93, 98). El método de diálisis LC se considera adecuado para la encapsulación de moléculas hidrofóbicas o de drogas con motivos hidrofóbicos como las proteínas de membranas (93). Este proceso tiene una cinética lenta y se forma un liposoma intermedio de pequeña talla que da lugar a cocleatos de pequeño tamaño. Por el contrario, se considera que el método DC probablemente no involucre la formación de los liposomas intermedios, y que el mecanismo implique una competencia entre la remoción del detergente de las micelas compuestas por detergente, lípidos y el medicamento; y la condensación de la bicapa por

el calcio. El resultado de este proceso son estructuras en forma de aguja, de talla y diámetro superiores a los obtenidos con el método LC (93).

Los AFCo1 y 2 derivados de PL de membranas externas bacterianas se han obtenido mediante diálisis rotacional, basado en el principio del método de diálisis DC, en el cual la diálisis se realiza en tubos Corning inclinados, para mejorar el contacto entre los PL y el tampón de formación constituido entre otros componentes por el cloruro de calcio (98, 100, 105, 106). Sin embargo, éste método no permite, por su configuración, el procesamiento de grandes volúmenes de PL, no es escalable, y no permite la obtención de un producto en condiciones de esterilidad requeridas para la administración en humanos.

II.3.3 Filtración tangencial (FT)

La filtración tangencial es un método de diafiltración que permite la separación sólido/líquido. Se basa en la constante recirculación de una suspensión celular o de partículas de forma tangencial a una membrana porosa, donde el filtrado (soluciones y pequeñas moléculas) pasa a través de los poros de dicha membrana, dando como resultado neto la concentración del material celular y la eliminación de los componentes solubles del medio. También, mediante la filtración tangencial es posible realizar el cambio de solvente de la suspensión de partículas (58).

En la actualidad, este tipo de operación se ha convertido en una herramienta importante para la separación de suspensiones biológicas, lo cual ha desplazado a los métodos de separaciones convencionales como la centrifugación y la filtración rotatoria. Una de las principales ventajas que presenta consiste en la posibilidad de realizar un proceso aséptico sin la generación de aerosoles. Los procesos de filtración tangencial utilizan

membranas de porosidad controlada, que permite su aplicación en la microfiltración, ultrafiltración, nanofiltración, entre otras (58).

La filtración tangencial tiene un amplio uso en diversas ramas como: la alimenticia, la metalurgia, la industria cosmética, el tratamiento de aguas, la separación del plasma de los demás componentes de la sangre, etcétera. En la industria biotecnológica, su uso tiene tres aplicaciones fundamentales: separación de células y proteínas, así como cambio del medio; perfusión; clarificación de proteínas o células (58). Utilizando estos principios es posible la sustitución de los procesos convencionales de diálisis, en bolsas de membrana de nylon, por la diafiltración tangencial considerando las ventajas de ésta última como se ha mencionado, además de brindar la posibilidad del trabajo con grandes volúmenes de producto, de vital importancia en el escalado de productos farmacéuticos (58).

Separación celular mediada por membranas.

La membrana es una barrera “delgada” entre dos fluidos que restringe el movimiento de uno o más componentes de ambos fluidos a través de ella, discrimina entre diferentes tipos de moléculas teniendo en cuenta diferencias de tamaño o peso molecular y diferencias de forma o de estructura química. Una membrana puede ser fabricada a partir de una amplia variedad de materiales: orgánicos e inorgánicos, en forma asimétrica o isotrópica, en hojas o en tubos, entre otras. Según su configuración se pueden clasificar en membrana plana, fibra hueca, espiral (58).

Procesos conducidos por diferencia de presión

Los procesos de membrana gobernados por la diferencia de presión son los más usuales, entre ellos se encuentran la microfiltración, ultrafiltración y ósmosis

inversa, filtración de fondo muerto (*dead-end*) y filtración con flujo cruzado o tangencial (*cross-flow*) (58).

Filtración por flujo de fondo muerto

En este tipo de filtración la alimentación pasa a través de la membrana, la cual es la única salida de la cámara de filtración. La dirección de la corriente de alimentación es perpendicular a la superficie de la membrana (107) (Anexo1).

Filtración por flujo tangencial

El proceso de flujo tangencial se basa en la velocidad a la cual el material fluye paralelamente sobre la superficie de la membrana, y su importancia radica en que genera un número de fuerzas que tienden a eliminar las partículas depositadas en la superficie de la misma, ayudando así a mantener la membrana limpia (107).

La aplicación práctica de los procesos de filtración es limitada por el severo ensuciamiento (“fouling”) de las membranas. Para reducir esto, el proceso se lleva a cabo en un modo de flujo cruzado o tangencial, (Anexo2), donde el flujo de alimentación tangencial a la membrana arrastra el material depositado en ésta (108).

La presión transmembranal es aplicada a través de la membrana y de forma transversal a esta como su nombre lo indica (107). Las tres presiones medidas generalmente en un sistema son la presión de alimentación (p_a), la presión del retenido (p_r) y la presión de permeado o filtrado (p_f), de esta forma se puede calcular el valor de la presión transmembranal (PTM) para un momento dado del proceso.

En una curva típica de flujo contra tiempo que describe un proceso de filtración tangencial, se observa un rápido decline del flujo al inicio del proceso (rango dinámico rápido, que coincide con la formación y compresión de la torta), seguido por un

decremento gradual (rango dinámico lento, que coincide con el fouling) hasta que se alcanza el estado estacionario (pseud estado estacionario) (109) (Anexo 3).

Factores y parámetros que afectan la filtración tangencial por flujo cruzado

Existen diferentes factores y parámetros operacionales que afectan el proceso de filtración por flujo tangencial: influencia de la presión transmembranal; de la velocidad de flujo cruzado; de la concentración de la suspensión a filtrar; del tamaño y forma de las partículas; del diámetro de los poros de la membrana; del ambiente físico-químico; fuerzas interfaciales e influencia de la estrategia de arrancada (57, 58).

De manera general se puede decir que el uso de la filtración tangencial se ha convertido en un método útil para la eliminación eficiente de moléculas grandes y obtención estable de nanopartículas de dispersión a escala de laboratorio. También tiene gran potencial para el escalado de productos que requieren las industrias (110).

La configuración de membrana plana se ha empleado previamente en el proceso de obtención del AFCo1, pero los rendimientos fueron bajos (inferiores al 25%) debido a colatación de la membrana (99). El empleo de la configuración de fibra hueca podría solucionar tales dificultades ya que con esta configuración se evita la acumulación de las partículas cocleares en los canales y esquinas del casete, como ocurre en la membrana plana (111).

II.4 Estabilidad y ensayos de seguridad de adyuvantes

Durante décadas se han desarrollado numerosos estudios investigativos dirigidos a la búsqueda de nuevos adyuvantes. La selección y el uso de los mismos dependen de la respuesta inmune que se desea para una enfermedad determinada y del antígeno que se vaya a emplear en la formulación. Varios tipos de moléculas, diferentes en su naturaleza,

han sido estudiadas partiendo de su capacidad de mejorar la respuesta inmune frente a vacunas, tal es el caso de: complejos inmunoestimuladores (ISCOMs), emulsiones microfluidizadas, productos sintéticos, liposomas y citoquinas. A pesar de esto, las vacunas licenciadas hasta el momento se encuentran adyuvadas con sales de aluminio o calcio. Los mecanismos de acción de estas sustancias han sido estudiados exhaustivamente así como sus reacciones (efectos adversos), los cuales son altamente variables. Las Autoridades Nacionales Regulatoras, en su función de velar por la calidad, seguridad y eficacia de los productos de uso humano, han seguido el desarrollo de nuevos adyuvantes, como un aspecto relevante dentro de los procesos de Autorización de Ensayos Clínicos y el Registro Sanitario de vacunas (112).

La gran diversidad de moléculas y combinaciones que se proponen como adyuvantes en la actualidad hacen muy difícil la homogenización de requerimientos, lo que explica que al menos hasta el 2007 no existían regulaciones definitivas con respecto a los requerimientos para la evaluación de los adyuvantes. Sin embargo, la importancia y la necesidad de la evaluación inmunotoxicológica de nuevos adyuvantes ha sido identificada, y es considerado relevante en las etapas de desarrollo, análisis y aprobación de nuevos adyuvantes de vacunas (112).

En Cuba existen dos normativas y guías que establecen los requerimientos para el Registro de productos y otra para la aprobación de Ensayos Clínicos. Estas regulaciones aplican tanto para productos farmacéuticos como biológicos, con consideraciones específicas para el caso de vacunas, productos biológicos y biotecnológicos. Como la normativa nacional no considera la aprobación para componentes independientes, ni para Ingrediente Farmacéutico Activo (IFA), ni para adyuvante, las regulaciones

mencionadas anteriormente son también empleadas para la evaluación de adyuvantes e IFA, como parte integrante de las vacunas u otro sistema de formulación y esto constituye un obstáculo debido a la debilidad de estas regulaciones con respecto a los requerimientos particulares que deben tenerse en cuenta en el proceso de aprobación de nuevos adyuvantes (112).

Solo para aquellas formulaciones que contienen sales de aluminio (hidróxido o fosfato), la evaluación del adyuvante *per se* no es necesaria. En la actualidad, en Cuba, 9 de 12 vacunas registradas son adyuvadas con gel de hidróxido de aluminio y una con fosfato (112).

En la actual estrategia del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos (CECMED) para la evaluación de nuevos adyuvantes, la documentación mínima requerida está dirigida a la armonización de aspectos que otras Agencias Regulatorias Mundiales (ARM) han propuesto, que pueden agruparse al igual que en vacunas por fases (113): la caracterización biofísica del adyuvante, la evaluación de los estabilizadores, la investigación de las interacciones del antígeno y el adyuvante, la evaluación de los materiales en contacto con el producto, tales como las membranas de filtros de esterilidad y el monitoreo de la estabilidad en tiempo real y en condiciones aceleradas.

La caracterización biofísica incluye varias técnicas analíticas con el objetivo de determinar el pH apropiado, las soluciones tampones y las fuerzas iónicas que evitan la agregación del mismo, y mantienen un foldeo adecuado para los estudios preclínicos. Estos estudios van seguidos de la evaluación de los estabilizadores que incrementen la estabilidad química y física con vistas a lograr una vida en estante de 3 años que es lo

esperado para las vacunas. El otro aspecto, es determinar la capacidad del adyuvante para inducir el tipo de respuesta inmune deseada para un antígeno determinado, y cómo se produce la interacción con el antígeno. También es importante evaluar el efecto de la formulación al contacto con filtros estériles y finalmente, todas estas investigaciones deberán ser soportadas por los estudios de estabilidad en tiempo real y acelerado, lo que permite verificar que los cambios de la formulación durante el desarrollo de los procesos de obtención mantienen el adyuvante en un estado químico y físico estable. De hecho, es importante entender como las condiciones extremas ambientales, como las altas temperaturas pueden afectar la estabilidad de la formulación. Las correlaciones de la estabilidad acelerada con los datos de la estabilidad en tiempo real, son importantes para determinar la fecha de expiración y la determinación del impacto de las variaciones de temperatura durante el transporte y almacenamiento de las vacunas, como un todo, para los ensayos clínicos. En el inicio de estos estudios es importante entender los mecanismos de degradación del antígeno y del adyuvante. Por lo general, la inestabilidad física se relaciona con la pérdida de la estructura de la proteína y la agregación, mientras que las formas comunes de degradación química son la oxidación y la desaminación (113, 114). Para el análisis de estos tipos de degradación se ha empleado el método de la cinética de Arrhenius, el cual a partir de los datos de la estabilidad acelerada y en tiempo real permite predecir si una vacuna expuesta a condiciones anormales en un periodo de tiempo se mantiene dentro del rango de potencia y si puede ser administrada a humanos (113, 114). Los estudios de estabilidad acelerada también permiten conocer el impacto de otros factores en la estabilidad de la formulación. El estrés ambiental, dado por los ciclos de descongelación/congelación, la

larga exposición a la luz, así como el contacto con otros materiales de almacenamiento, también son aspectos a tener en cuenta. Toda esta información puede ser empleada en el desarrollo de una formulación más robusta (115, 116).

Otro aspecto importante en la evaluación del posible uso de un adyuvante son los estudios preclínicos de seguridad. Hay que destacar que estos estudios pueden ser usados para seleccionar dosis apropiadas e identificar situaciones donde se deben garantizar con cuidado rangos de dosis para los estudios de fase I. Además, estos estudios pueden avalar nuevas dosis y esquemas, o detectar situaciones especiales durante el desarrollo del producto (117).

Estos estudios tienen como objetivo: la evaluación del perfil tóxico que pueda tener el adyuvante de forma independiente, es decir, fuera de la formulación; demostrar su efecto sobre la respuesta inmune mediante la evaluación de la vacuna con y sin adyuvante, en modelos animales apropiados, si existen; evaluar la relación antígeno-adyuvante seleccionada y demostrar que la relación antígeno/adyuvante no provoca un sinergismo de eventos adversos en el modelo animal comparado con los componentes individuales. Por tanto, además de los estudios que deberán realizarse para evaluar el perfil de seguridad del adyuvante dentro de la formulación; los estudios preclínicos de inmunotoxicidad deberán ser incluidos, con el objetivo de demostrar, un balance riesgo-beneficio apropiado, antes de avanzar a una fase en humanos. Estos estudios inmunotoxicológicos estarán caracterizados por: estudios de tolerancia local; observación de reacción en el sitio de administración; inducción de hipersensibilidad y anafilaxis; pirogenicidad; toxicidad sistémica en tejidos y órganos; alteración del sistema inmune; toxicidad reproductiva, carcinogénesis; genotoxicidad o mutagenicidad;

evaluación de mutaciones génicas o daño cromosómico. Los estudios de toxicidad por dosis única y repetida, deben ser incluidos en esta caracterización. También se tendrán en cuenta estudios bioquímicos en sangre y estudios de farmacocinética, principalmente para los casos de nuevos adyuvantes y cuando se pretende usar otras vías alternativas de administración (112, 118, 119-121).

La selección de nuevos adyuvantes refleja un compromiso entre los requerimientos de adyuvación y un nivel aceptable de reacciones adversas. Es por ello, que el análisis riesgo–beneficio debe incluir la argumentación de la selección del adyuvante y para ello el análisis químico-biológico y preclínico debe ser realizado (112).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Obtención de AFCo1 a partir de proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*

serogrupo B por filtración tangencial

III.1.1 Obtención del proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B

Los PLs se obtuvieron en forma de precipitado alcohólico, a partir de la membrana externa de *N. meningitidis* serogrupo B (cepa Cu 385-83 (B: 4:P1.19.15; L3, 7,9); en la planta de producción de vacunas del Instituto Finlay y según los procedimientos de producción establecidos, en condiciones de buenas prácticas (69). Este ingrediente farmacéutico activo (IFA) se conservó como una pasta o torta alcohólica a temperatura de -70°C .

III.1.2 Determinación de las condiciones óptimas para la formación del

AFCo1 por filtración tangencial

Se trazó una estrategia de evaluación de diferentes soluciones y parámetros del proceso para su escalado piloto. Diferentes rangos de presiones se evaluaron para garantizar el control del flujo de filtrado durante las etapas de formación y lavado de cocleatos tal y como se muestran en la Tabla 1. Se realizaron modificaciones de los tampones empleados para la resuspensión del PL y en las diafiltraciones realizadas para la adición de calcio y la eliminación del detergente residual. La composición de los tampones empleados se describe en la Tabla 2. Todas las evaluaciones y modificaciones propuestas se realizaron con vistas a incrementar la eficiencia del proceso y la seguridad del producto.

III.1.3 Filtración tangencial con fibra hueca

Para la FT en fibra hueca se utilizó un cartucho de polisulfona de 10 kDa de porosidad, diámetro interior de la fibra de 1 mm y área de filtración de 0,45 m² (Amicon). El sistema utilizado estuvo compuesto por el recipiente utilizado como reservorio (Botellón de 5L), una bomba principal (Watson Marlow 701S/R), un manómetro conectado a la entrada del cartucho, una bomba auxiliar (Watson Marlow 302S), una válvula en el retorno, mangueras de conexión de silicona y el cartucho de fibra hueca (Anexo 4).

La Figura 1, muestra de forma esquemática el proceso que se llevó a cabo. Todos los procesos se realizaron utilizando una solución de PL, ajustada a 1,3±0,2 mg/mL de proteínas en tampón de resuspensión (TR) según el método descrito por Lowry (122), la cual se incubó por 30 min. a 37oC y se sonicó en baño de agua a 37oC durante 30 minutos. Posteriormente, la solución de apariencia transparente se filtró empleando una membrana de filtración de 0,22 µm (Minisart, Sartorius, Alemania). Luego de este tratamiento, la solución de trabajo se sometió a un proceso de diafiltración. Se empleó un volumen de trabajo de 2,0 a 3,0 L. La filtración (tanto en la etapa de formación como de lavados), se realizó a volumen constante en todos los procesos.

En la primera etapa se llevaron a cabo 4 cambios del volumen de trabajo con tampón de formación (TF). Posteriormente, se diafiltró de 6 a 8 veces utilizando el tampón de lavado (TL), con el fin de eliminar el detergente residual y exceso de calcio.

III.2 Evaluación del proceso

III.2.1 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteínas se realizó mediante la técnica de Lowry (122). A esta técnica se le realizó modificaciones, donde las muestras de AFCo1 se trataron con

EDTA y DOC a una concentración final de 2 mM y 0,2%, respectivamente. La concentración de proteínas se utilizó tanto para evaluar el proceso de obtención como para determinar el rendimiento de este. En todos los casos, se empleó una curva estándar de albúmina de suero bovino (ASB, Sigma, EUA) en un rango de concentración de 0,036 a 0,18 mg/mL.

III.2.2 Cuantificación de fosfolípidos

La concentración de Flps se realizó mediante el método de mineralización de Fiske Subarrow (55, 123). Las muestras a cuantificar se calentaron en baño de arena a 200°C hasta su evaporación. Posteriormente, se añadió 0,5 mL de HClO₄ (Merck, Alemania) al 70% con agitación vigorosa y los tubos se calentaron nuevamente a 200°C hasta su completa decoloración. Luego se dejaron enfriar las muestras antes de añadir 7,5 mL de NH₄Mo₇O₂₄ (BDH, Reino Unido) al 0,22% y se agitó vigorosamente. Posteriormente se adicionó 0,3 mL del reactivo de Fiske Subarrow formado por : 30g de NaHSO₃ 30 g (BDH, Reino Unido), 1 g de Na₂SO₃ (Merck, Alemania) y 0,5 g de ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico (ANSA, Merck, Alemania) en agua bidestilada) y se agitó nuevamente. Finalmente, se calentó 100°C durante 15 min. en baño de agua (Retomed, Cuba) y se determinaron los valores de absorbancia a 832 nm (Ultrospec III, Pharmacia, Suecia). La concentración de fosfatos se determinó utilizando una curva patrón de KH₂PO₄ (Merck, Alemania) a 2x10⁻⁴ mol/L, este valor se convirtió a concentración de Flps utilizando un factor gravimétrico de 25.

III.2.3 Determinación de la eficiencia de incorporación de los principales componentes del PL en el AFCo1

La eficiencia de la incorporación de los componentes del PL en el AFCo1 se evaluó a partir de la determinación del porcentaje de Flps y proteínas del PL que se transformaron en estructuras cocleares. Para ello, se utilizó la propiedad de los sólidos en suspensión, de sedimentar espontáneamente o luego de una centrifugación leve. Se calculó la relación entre el contenido total de Flps y proteínas en la suspensión, denominado como AFCo1 tot, y en el sedimento que se obtiene luego de dejar reposar la formulación 30 min. o centrifugarla a 3000g durante 15 min., se elimina el sobrenadante y se resuspende en TF (AFCo1res). La fórmula general que se aplicó fue:

$$\% \text{ Inc} = \text{AFCo1 res} / \text{FCo1 tot} \times 100$$

AFCo1 res: Estructuras cocleares en la resuspensión (después de centrifugación)

AFCo1 tot: Estructuras cocleares más proteínas no incorporadas en el cocleto

III.2.4 Determinación de Desoxicolato de Sodio residual, por cromatografía gaseosa

La determinación del contenido de Desoxicolato de Sodio, en las muestras tomadas durante el proceso se realizó por el método de Cromatografía Gaseosa (CG) acoplado a Espectrometría de masas (EM). Brevemente, se convirtió el DOC en ácido deoxicólico, extraído con un solvente orgánico. Se secaron las muestras, utilizándose como referencia interna sal sódica del ácido cólico. A través de CG se realizó la separación del ácido deoxicólico y el ácido cólico, detectándose ambos compuestos por EM a partir de sus tiempos de retención relativos.

Se utilizó un Espectrómetro de masas (HP-5973) acoplado al Cromatógrafo Gaseoso (HP-6890, Tecnología Agilent). Para ello, 400 μL de la muestra se introdujeron en un tubo eppendorf y se añadieron 100 μL de la solución de sal sódica de ácido cólico como estándar interno (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para la precipitación se adicionaron 10 μL de ácido sulfúrico concentrado (98,08 g/mol) y la extracción se realizó con 300 μL de acetato de etilo. Para la derivatización se empleó una mezcla de: Ioduro de amonio: Mercaptoetanol (MSTFA) en la proporción 1000:6:2 v/p/v.

Se utilizó una columna HP Ultra-1. 17 mm X 0,25 mm ID X 0,33 μm . Los parámetros cromatográficos fueron: $T_i = 255^\circ\text{C}$ (1 min.), rampa = $2^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 270°C , rampa = $30^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 290°C , $T_f = 300^\circ\text{C}$ (3 min.). Se utilizó Helio como gas portador. El flujo de la columna fue de 0,7mL/min. y el volumen inyectado de 1 μL .

El método de medición en el Espectrómetro de Masas fue SIM (Monitoreo selectivo de iones) con Nadoc: ($m/z = 428,345$) y sal sódica de ácido cólico ($m/z = 426,516$). Se utilizó una curva de calibración desde 5 hasta 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la mezcla de Nadoc y sal sódica de ácido cólico.

III.3 Caracterización morfológica e inmunoquímica del AFCo1 obtenido por filtración tangencial con fibra hueca

III.3.1 Microscopía óptica

La observación de los cocleatos se realizó en un microscopio óptico con contraste de fase (OPTON standard 25, Alemania). Se utilizó un lente ocular enfocable 10X (W-KpL, 10:100, 19 mm) y un lente objetivo de 40X. El tamaño de las estructuras cocleares derivadas de PL, se determinó mediante el empleo de una escala graduada acoplada a la lente objetivo (retículo ocular 10:100, 19 mm, W-Kpl 10x/18, CarlZeiss, Méjico) del

microscopio mediante la medición de la longitud (μm) de 200 partículas en cada muestra. Con estas mediciones se determinó la media aritmética y la desviación estándar de la media.

III.3.2 Microscopía electrónica de barrido

Las muestras se colocaron en láminas de cristal (124) y se sumergieron en una mezcla líquida de propano/isopentano (3:1, v:v), posteriormente se secaron por punto crítico (toda la noche a temperatura de -80°C) y se realizó un proceso de metalizado con oro y paladio (Metalizador Polaron SC515). Las muestras se observaron en un microscopio JSEM 6400 que trabajó con un voltaje entre 6 y 3kVolt y con una interfaz digital ADDA3.

III.3.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida

Las proteínas presentes en las estructuras cocleares y PL se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Merck, Alemania) al 12,5% con duodecil sulfato de sodio (SDS) (ProbuS, EUA) al 0,1% (SDS-PAGE) (125) . Las muestras se prepararon a una concentración de 1mg/mL en tampón para tratamiento de las muestras (2% (p/v) SDS, 60 mM TrisHCl pH 6.8, 10% (v/v) glicerol (Merck, Alemania), 0,001% (p/v) bromofenol azul (Sigma, EUA) y se calentaron a 100°C durante 10 minutos. Se aplicaron 25 μg por pozo y se realizó la corrida a 80 Volt, durante 90 minutos. Los geles se tiñeron con azul Comassie para visualizar las bandas correspondientes.

III.3.4 Inmunotransferencia

El ensayo de inmunotransferencia se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Burnett WN (126). Brevemente, se realizó el SDS-PAGE a las muestras (acápite III.3.3). La transferencia electroforética se realizó en cámara sumergida (BioRad, EUA) durante 14-

16 horas, a 4⁰C, con una intensidad de corriente de 30 mA, voltaje libre empleando una membrana de nitrocelulosa (HybonFT^M-C extra, E.U.A). Una vez realizada la transferencia, las membranas se bloquearon con leche descremada (Merck, Alemania) al 5% en solución salina tamponada con fosfato 0,15 mol/L, pH 7,2 (SSTF) a temperatura ambiente (TA) durante 1 hora. Seguidamente, se incubaron durante 18 horas a 4⁰C con sueros de ratón con altos títulos de IgGs contra las proteínas de membrana externa de *N. meningitidis* B, diluidos 1:200 en SSTF con leche descremada al 1% y Tween-20 (Sigma, EUA) al 0,01% (v/v). Para la detección de los anticuerpos específicos se utilizó un conjugado anti IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma, St. Louis, MO, EUA) diluido 1:5000 en SSTF Tween-20 al 0,01% (v/v) con incubación 1h a TA. Finalmente, se realizó el revelado utilizando diaminobencidina como sustrato (Sigma, E.U.A) a una concentración de 0,5 mg/mL disuelta en tampón citrato (ácido cítrico 0,1 mol/L (BDH, Reino Unido) y monohidrógenofosfato de sodio 0,2 mol/L, pH 5) en presencia de dimetilsulfóxido (1%, v/v) (Merck, Alemania), cloruro de cobalto (2%, v/v) (Merck, Alemania) y peróxido de hidrógeno al 0,015% (Fluka, Suiza). Entre todos los pasos de incubación se realizaron lavados con SSTF-Tween-20 al 0,01% (v/v).

III.4 Animales de experimentación

La evaluación de la respuesta inmune se realizó en ratones BALB/c hembras procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, La Habana, Cuba). La atención de estos animales se realizó de acuerdo a las normas institucionales establecidas, según la Guía para el cuidado y empleo de los animales de laboratorio de la Comunidad Económica Europea (127). Se emplearon además, ratones hembras BALB/c procedentes del Centro Multidisciplinario de Investigaciones

Biológicas (CEMIB) (Unicamp, Campinas, Brasil). La atención de los animales se realizó de acuerdo a las normas establecidas en el Instituto de Medicina Tropical de la Facultad de Medicina de la Universidad de São Paulo, Brasil. Todos los procedimientos se realizaron con la autorización y aprobación del Comité de Ética Brasileño de Animales de Laboratorio en el Incor, Brasil. En el diseño, ejecución y evaluación de los trabajos que implicaron el uso de animales de experimentación se cumplieron los principios generales bioéticos de refinamiento, reemplazo y reducción (RRR), así como el manejo de animales de laboratorio y las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) (128). Los animales empleados tenían de 6-8 semanas de edad y con 20 ± 2 g de peso corporal al inicio de los experimentos. Los animales permanecieron bajo condiciones controladas de temperatura (21-24°C), humedad (20-25%), ciclo alternado de luz/oscuridad de 12 h, así como recibieron alimentación y agua acidulada con HCl a un pH 2,5 *ad libitum*. Para todos los experimentos, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en grupos individuales de 5 animales cada uno. El sacrificio de los mismos se realizó mediante dislocación cervical, para evitar la posible influencia de los anestésicos en los estudios celulares.

III.4.1 Inmunización

Los ratones se distribuyeron en grupos de 5 animales y se inmunizaron con las estructuras cocleares obtenidas de los diferentes procesos de FT. En todos los casos el AFCo1 se administró por vía intranasal (IN), aplicándose 50 μ g referidos a la concentración de proteínas en un volumen de 25 μ L (12,5 μ L por cada fosa nasal). El esquema de inmunización utilizado consistió en tres dosis con un intervalo de 7 días entre cada dosis.

Como control negativo se empleó un grupo placebo al que se le administró Tris (30mM)-CaCl₂ (3mM) (TL).

III.4.2 Toma de muestra

La muestra de sangre para la determinación de las inmunoglobulinas en suero se realizó 14 días después de la última dosis. En el caso de la determinación de las subclases de anticuerpos séricos (IgG1, IgG2a), la muestra se tomó 21 días después de la última dosis. La extracción de la misma se realizó mediante punción retro-orbital utilizando capilares de vidrio heparinizados. Las muestras de sangre obtenidas se incubaron durante 1h a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 12500 g durante 20 min para extraer el suero.

La toma de muestras de saliva se realizó 7 días después de la última dosis; para ello se estimuló la salivación en los animales con la aplicación intraperitoneal de 50 µL de pilocarpina al 0,5% (Quimefa, Cuba). Las muestras se mantuvieron sobre hielo durante la extracción y se inactivaron inmediatamente a 56°C durante 15 minutos, con el objetivo de inhibir las enzimas. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 9500 g durante 15 min. a 4°C, se colectaron los sobrenadantes y se conservaron a -20 °C.

III.4.3 Extracción y estimulación de células de bazo

Para el aislamiento de las células del bazo, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical, 15 días después de la última dosis. Una vez obtenido el bazo de la cavidad abdominal, se extrajeron las células por perfusión con medio D-MEM (Sigma, EUA) y luego se lavaron con SSTF frío. Las células se centrifugaron a 9500 g por 10 min. a 4°C y se trataron con solución hemolítica estéril (NaCl 0,2% y NaCl 1,6% respectivamente, 1 minuto con cada solución) y se resuspendieron en medio D-MEM completo (10%

Suero bovino fetal (SBF), 1% L-Glutamina, y 1% Gentamicina). Se realizó el conteo celular en cámara de Neubauer y se determinó la viabilidad mediante tinción de exclusión con Tripán azul. Las células aisladas se ajustaron a 4×10^6 células/mL y se estimularon con PL, 3 $\mu\text{g/mL}$ referido a la concentración de proteínas, utilizando placas de 24 pozos. Las células se cultivaron a 37°C en atmósfera húmeda y 5% de CO_2 en una incubadora (ASSAB, Suecia). Luego de 72 h de incubación las células se centrifugaron a 9500 g durante 10 min y se tomaron los sobrenadantes para cuantificar $\text{IFN}\gamma$ e IL-5.

III.5 Evaluación de la inmunogenicidad

Se empleó la técnica de ELISA para detectar y cuantificar la presencia de Ac anti PL de *N. meningitidis* serogrupo B. En todos los ELISAs realizados se utilizaron placas de 96 pozos de alta capacidad de unión (Maxisorp, Nunc, EUA) y se recubrieron con 100 $\mu\text{L/pozo}$ de una solución de 20 $\mu\text{g/mL}$ de PL diluido en solución tampón de recubrimiento (Na_2CO_3 11 mM, NaHCO_3 35 mM (pH 9,6), se incubaron a 4°C , 18h. Luego se adicionó solución de bloqueo (ASB al 1% (p/v) en SSTF) 1 h a TA en cámara húmeda. Posterior a la adición de las muestras y del conjugado, se adicionaron 100 $\mu\text{L/pozo}$ de una solución de peróxido de hidrógeno 0,01% (v/v) y del cromógeno ortho-fenilendiamina (OPD) 0,6mg/mL en solución tampón sustrato (STS) (Na_2HPO_4 52 mM y ácido cítrico 25 mM (pH 5,6) y se incubaron en la oscuridad durante 30 minutos. La reacción se detuvo mediante la adición de 50 μL de una solución de H_2SO_4 2M. La densidad óptica (DO) se leyó a 492 nm en un lector de microplacas (Titertek, Multiskan Plus, EUA). Después de cada paso de incubación las placas se lavaron tres veces con solución de lavado (SSTF, Tween-20 0,1%, pH 7,4).

III.5.1 ELISA de IgG anti proteoliposoma en suero

Se determinó la respuesta de IgG anti PL, donde el suero de referencia (Materiales de Referencia, Instituto Finlay) y los sueros a evaluar se diluyeron 1:200, en solución de bloqueo-Tween-20 al 0,1% (v/v). Se aplicaron 100 μ L/pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales y del suero de estándar de anticuerpos. Las placas se incubaron a 37°C por 2 horas. Se adicionaron 100 μ L/pozo de un Anticuerpo Monoclonal (AcM) de carnero anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), diluido 1:2000 en solución de bloqueo-Tween 20, 0,1% (v/v), durante 1 h a 37°C en cámara húmeda. Como estándar de anticuerpos, para los ensayos de IgG anti-PL, se empleó una curva elaborada con diluciones dobles seriadas de un suero de ratón hiperinmune, obtenido a partir de un suero de referencia para el serogrupo B del meningococo, proveniente del Centro para el Control de las Enfermedades de Atlanta, en inglés “Center for Disease Control, CDC”. Se evaluó el comportamiento paralelo entre las curvas y se calculó la ecuación de ajuste lineal, así como el coeficiente R^2 . El suero estándar del CDC 1992 se definió como la variable independiente (x) y el suero estándar producido en el Finlay como la variable dependiente (y). Se determinó la concentración final sustituyendo en la fórmula, los valores del estándar del CDC 1992 para IgG específica. Mediante el empleo de la curva sigmoideal estándar, se le asignaron 5000 U/mL de anticuerpos IgG anti-PL al máximo punto de la curva y 31,25 U/mL al punto mínimo. Los resultados de IgG anti-PL se calcularon interpolando la DO obtenida para cada uno de los sueros en la curva patrón elaborada con el suero de referencia y se expresaron en U/mL.

III.5.2. ELISA de IgA anti proteoliposoma en saliva

Las muestras de saliva utilizadas como curva de referencia y las muestras de saliva obtenidas de cada animal, se diluyeron en solución de bloqueo-Tween-20 0,1% (v/v), esta última en proporción 1:2. Se aplicaron 100 μ L/pozo por duplicado de las diluciones de las muestras individuales. Las placas se incubaron a 37°C por 2 horas. Se adicionaron 100 μ L/pozo del conjugado anti-IgA (R5-140) de ratón biotinilado (SIGMA, St. Louis, MO, EUA), a una concentración de 2 μ g/mL en solución de bloqueo -Tween-20 al 0,1% (v/v), y se incubaron durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se añadió estreptavidina-peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo-Tween-20 al 0,1% (v/v) y se incubó 30 min. a 37°C. Como estándar interno de anticuerpos, para los ensayos de IgA anti-PL, se empleó una curva elaborada con muestras de saliva de ratones hiperinmunes. Mediante el empleo de la curva sigmoideal estándar, se emplearon diluciones dobles seriadas y se le asignaron 2000 unidades arbitrarias (UA) de anticuerpos IgA anti-PL al máximo punto de la curva y 62,5 UA al punto mínimo. Los resultados de IgA anti-PL se calcularon interpolando la DO obtenida para cada una de las muestras en la curva patrón elaborada con la saliva de referencia y se expresa en UA. Las muestras se consideraron positivas cuando los valores del título se encontraron por encima de 250 UA, este valor de corte se calculó después de evaluar las muestras de 100 animales sin inmunizar y se estableció el rango como el promedio de estas muestras por 2 desviaciones estándar (129).

III.5.3 Determinación de subclases de IgG1 e IgG2a anti-proteoliposoma

Las subclases de IgG se determinaron mediante ELISA con el sistema de amplificación estreptavidina-biotina. Los sueros a evaluar se diluyeron 1:100 en solución de bloqueo-

Tween-20 0,1% (v/v). Se aplicaron 100 μ L/pozo por duplicado de las diluciones de los sueros individuales. Las placas se incubaron a 37°C por 1 h luego de lo cual se lavaron cinco veces con solución de lavado. Se aplicaron 100 μ L/pozo de los AcMs de carnero anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón biotinilados (Amersham International, Little Chalfont, Reino Unido), diluidos 1:1000 en solución de bloqueo-Tween-20 0,1% (v/v), y se incubaron durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. Posteriormente, se añadió estreptavidina-peroxidasa (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo-Tween-20 0,1% (v/v) y se incubó 30 min. a 37°C Los resultados se expresan en unidades de DO.

III.5.4 Determinación de IFN γ e IL-5 por ELISA

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc, Dinamarca). Se recubrieron las placas con 50 μ L/pozo de AcMs (anti-IFN γ y anti-IL-5) de ratón (Pharmingen, EUA) obtenidos en rata, como anticuerpos de captura. Estos anticuerpos se diluyeron en solución de fosfato de sodio 0,1M (pH 9,0) a 4 μ g/mL. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de bloquear con solución de bloqueo (SSTF suplementado con 10% de SBF) durante 1h a 37°C, se adicionaron 100 μ L/pozo por triplicado de los sobrenadantes del cultivo de las células de bazo aisladas de ratones inmunizados con PL, AFCo1 o el control negativo, las placas se incubaron 2 h a 37°C en cámara húmeda. Diluciones dobles seriadas de IFN γ o IL-5 recombinante de ratón en un rango entre 5 000 pg/mL y 156 pg/mL se incluyeron como curva estándar en todas las placas. Se aplicaron 100 μ L/pozo de un AcM producido en rata biotinilado anti-IFN γ o anti- IL-5 murino (Pharmingen, EUA) a una concentración de 2 μ g/mL en SSTF-10% SBF, y se incubaron durante 2 h a 37°C, luego se adicionaron 100 μ L/pozo de

estreptavidina-peroxidasa diluida 1:2000 (SIGMA, St. Louis, MO, EUA) y se incubaron las placas durante 1 h a 37°C. Los pasos posteriores se realizaron según se describe en el acápite III.5. Las concentraciones de IFN γ e IL-5 se expresaron en pg/mL y se determinaron interpolando el valor de DO de las muestras en la curva estándar.

III.5.5 Prueba de hipersensibilidad retardada

La capacidad de las estructuras cocleares de inducir reacciones de hipersensibilidad Retarda (HR) se evaluó en los animales inmunizados. Para ello, 21 días después de la última dosis, se administró por vía intradérmica, 50 μ g de PL (1 mg/mL) en la región dorsal de la extremidad posterior izquierda. Como control, se empleó SSTF administrado en la región dorsal de la extremidad posterior derecha. El volumen (mL) de la inflamación producida en ambas extremidades, se midió a las 24 y 48 h utilizando un plestimómetro automático (Plethysmometer, Ugo Basile, Italia). La inflamación inducida en la extremidad inyectada con el PL, se estimó como la diferencia entre los volúmenes de la extremidad izquierda y la derecha.

III.6. Diseño general del estudio preliminar de estabilidad de los cocleatos obtenidos mediante FT

Para el estudio de estabilidad se elaboró un protocolo en el cual se tuvo en cuenta:

1. . Estudiar el comportamiento de las características del producto terminado en su envase definitivo a temperaturas de 2–8°C y 30 \pm 2°C
2. Determinar la estabilidad del producto, en condiciones de almacenamiento exageradas o aceleradas.

Se planteó la realización de dos estudios: Estabilidad de vida en estante y en condiciones estrés.

Según las guías de la entidad reguladora cubana (CECMED), se plantea que el número mínimo de lotes a evaluar para realizar un estudio de estabilidad es 3. Para este estudio se disponía de 2 lotes, de tipo experimental, producidos a escala piloto (602 y 603), en las condiciones de FT establecidas en el proceso P-13-Co/B debido a que el tercero (lote 601) se rechazó en T0 por contaminación. Por las razones anteriormente planteadas el estudio se consideró como un resultado preliminar de la estabilidad del producto.

El estudio de vida en estante se realizó a 2–8°C y 30±2°C durante 12 meses y se muestreó a los 0, 3, 6 y 12 meses. El estudio en condiciones de estrés se realizó a 40°C durante 6 meses, el muestreo en éste caso se realizó los meses 1, 3 y 6 (Tablas 3, 4 y 5).

III.6.1 Determinación del tamaño de partícula de los cocleatos

La medición del tamaño de partícula se realizó por Difractometría láser. La misma se realizó en un analizador de partículas Delsa™ NanoC (Beckman-Coulter, Hialeah, FL). El tamaño promedio y el índice de polidispersión de los cocleatos, se determinaron con una fuente de láser fija y ángulo de luz desviada a 90°. Las muestras se diluyeron en Tris a una concentración de proteínas entre 1-1,3 mg/mL. Se realizaron diez réplicas en cada uno de los lotes experimentales evaluados y se determinó la media aritmética de la talla. Se consideró el tamaño de partícula adecuado un rango \geq que el 60% de los cocleatos menores de 50 μm (59). (Tablas 3, 4, 5).

III.6.2 Morfología

La determinación de la forma se realizó mediante Microscopía óptica y electrónica, según se describen en los acápites III.3.1 y III.3.2 (Tablas 3 y 4).

III.6.3 Determinación de pH

Previamente el ensayo se realizó la calibración del phmetro (Radiometer) con los correspondientes tampones de calibración de pH 4.00 y pH 7.00 (Radiometer Copenhagen) a temperatura de $25\pm 0,5$ °C.

Se vertieron en beaker de 25 mL de las muestras previamente homogenizados y se le introdujeron los electrodos. Se agitó por 3 min. utilizando un agitador magnético a una temperatura de $25\pm 0,5$ °C, se dejó reposar 1 min., tomándose posteriormente la lectura registrada en el phmetro como valos de pH. El rango propuesto fue de 6,5 -7,5 (Tablas 3 y 4).

III.6.4 Determinación de la apariencia

Para el ensayo de apariencia y color se homogenizaron las muestras con agitación manual moderada y posteriormente a trasluz con ayuda de una lámpara de luz fría, se verificó si las mismas presentaban un color blanquecino.

III.6.5 Determinación de la concentración de Ca^{2+}

Se realizó mediante Espectrometría de Absorción Atómica con llama estequiométrica de aire y acetileno. Se trata de un método analítico basado en la absorción de energía radiante por átomos neutros de Ca^{2+} y la correlación cuantitativa entre esa absorción y la concentración de los iones originalmente presentes en la muestra. Los parámetros instrumentales del Espectrómetro UNICAM Solar 919 utilizados para la determinación de Ca^{2+} fueron: longitud de onda (422,7 nm), intensidad de corriente (4 mA), ancho de rejilla (0,5 nm), altura de observación (10 mm), flujo de aire (4,6 L/min), flujo de acetileno (1,1 L/min). La absorbancia de cada muestra fue medida en el espectrómetro y por interpolación de estos valores en la expresión de la recta de calibración se

obtuvieron los valores correspondientes de concentración en $\mu\text{g/mL}$, de las muestras analizadas. Las muestras se diluyeron tantas veces como fue necesario de manera tal que sus absorbancias pudieran interpolarse dentro del intervalo lineal y de trabajo para la curva de calibración del Ca^{2+} .

III.6.6 Determinación de la concentración de proteínas

Se realizó la determinación de la concentración de proteínas mediante la técnica descrita en el acápite III.2.1 El límite de aceptación propuesto fue de $1,3 \pm 0,2 \text{ mg/mL}$.

III.6.7 Cuantificación del preservio

Se realizó la cuantificación del preservio mediante un método espectrofotométrico (130). El límite de aceptación de la concentración de timerosal propuesto fue de $0,7-0,13 \text{ mg/mL}$.

III.6.8 Comprobación de la identidad

La lectroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la inmunotransferencia se emplearon para comprobar la identidad del producto y ambas técnicas se realizaron según aparece descrito en los acápites III.3.3 y III.3.4, respectivamente. Se consideró aceptable si se observaban dos bandas mayoritarias entre 36 y 46 KDa y minoritarias entre 70 y 85 KDa, según lo descrito por el departamento de Control de la Calidad para PL de *N. meningitidis* del serogrupo B en la vacuana cubana VA-MENGOC- BC[®] (131).

III.6.9 Límite microbiano

La determinación del límite microbiano se realizó mediante el método de filtración por membrana. Se empleó un Medio Fluido de Tioglicolato, al cual se le realizaron los controles de calidad establecidos: características organolépticas, promoción de crecimiento (132) Para la realización del ensayo se tomó por duplicado con una

jeringuilla 10 mL de muestra y se añadieron en dos vasos de esterilidad. Se filtró el volumen de muestra y se colocó el tapón de seguridad a cada vaso. Se conectó la manguera del equipo de filtración a la bomba peristáltica, la aguja de succión al medio de cultivo y la aguja de llenado a cada vaso para transferir el medio de cultivo. Se taparon los vasos y se incubó uno de ellos de 20 a 25 °C y el otro de 30 a 35°C. Este mismo procedimiento se realizó para los controles de medio de cultivo y jeringuillas.

Durante el período de incubación y al final (14 días) se examinaron los medio de cultivo contenido en los vasos para detectar evidencia macroscópica de crecimiento. Si no se observa crecimiento microbiano, entonces el ensayo se considera satisfactorio. (Tablas 3 y 4).

III.6.10 Determinación de efectividad del preservio

Para determinar la eficacia del tiomersal como preservio se emplearon los siguientes microorganismos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Aspergillus niger* (ATCC 16404) y *Candida albicans* (ATCC 10231).

Para la realización del ensayo se emplearon 5 tubos conteniendo cada uno 10 mL del candidato vacunal AFCo1 por cada lote; se inocularon respectivamente 50 µL de cada uno de los microorganismos de ensayo a la concentración ajustada y se incubaron entre 20°C y 25°C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de incubación: T=0, 7, 14 y 28 días. Se empleó el método de filtración por membrana para realizar el conteo de UFC/mL a los diferentes tiempos. Se consideró como criterio de aceptación una reducción en las UFC/mL de al menos un logaritmo (log) a los 7 días y de al menos 3

log a los 14 días respecto al conteo inicial y un no incremento a los 28 días respecto a los 14 días (133), Tablas 3 y 4.

III.6.11 Determinación de IgG anti-Proteoliposoma en suero

Se determinó IgG anti-PL en suero mediante ELISA. La inmunización de los animales y la toma de muestra se realizaron según el procedimiento descrito en el acápite III.4.1 La determinación de IgG anti-Proteoliposoma en suero se realizó mediante la técnica descrita en el acápite III.5.1. El límite de aceptación que se propuso fue la seroconversión de IgG anti PL. (Tablas 3 y 4).

III.7 Estudios de toxicidad.

Modelo animal

Para los estudios de toxicidad: tolerancia local, dosis única y repetida, se emplearon ratas Sprague Dawley con un peso corporal de 100-150 g, de ambos sexos. Estos fueron suministrados por el CENPALAB, acompañados de sus certificados de calidad sanitaria y genética. El alojamiento y la alimentación se realizaron en condiciones similares a las descritas en el acápite III.4.

III.7.1. Ensayos de tolerancia local

Se emplearon 60 ratas Sprague Dawley distribuidas en grupos de 3 animales de igual sexo por caja, 10 cajas de cada sexo para conformar los grupos experimentales.

El estudio duró 28 días. En la Tabla 6 se resumen los grupos y tratamientos, el número de animales por grupo, sexo y el momento del sacrificio.

Se realizaron tres inoculaciones durante los días 0, 5 y 10; a todos los animales, excepto a los del grupo control. Se aplicaron 20 μ L en cada fosa nasal, en tres concentraciones del producto en ensayo y al grupo con diluyente se aplicó el mismo volumen.

Se realizó la exploración clínica de los animales dos veces al día durante las primeras 72 h y luego diariamente.

Se realizaron pesajes a todos los animales los días 1, 12 y 17. El agua se suministró *ad libitum*; no obstante, se registró el volumen consumido. Para ello, se depositaron 750 mL de agua en el frasco colocado en la caja de las ratas. En días alternos se midieron, según la propia graduación del frasco, el remanente de agua y se calculó, por diferencia, el volumen consumido por el grupo. Cuando se realizaron las mediciones se enrasaron nuevamente los frascos con 750 mL de agua. Para el cálculo del consumo medio diario por animal, el consumo del grupo se dividió entre el número de animales de la caja y el número de días transcurridos entre mediciones.

En el caso del alimento, al inicio y cada vez que se hizo una medición se completó en las tolvas de las cajas 500 g de pienso. Con ayuda de una balanza técnica se pesó el alimento remanente y se calculó el consumo medio diario por animal, como se describió para el agua.

Los días 12 y 17 después de la aplicación del último tratamiento se sacrificaron los animales para los estudios anatomopatológicos. El mismo se realizó por administración de una sobredosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (100 mg/Kg).

Se examinaron todos los órganos y se tomaron muestras de la cavidad nasal y encéfalo. Así mismo, se muestrearon aquellos órganos que presentaron alguna alteración al análisis macroscópico. La dirección y el número de secciones se realizaron según las recomendaciones de la Comunidad Económica Europea (CEE) para la evaluación de productos tóxicos (134).

III.7.2 Estudios de toxicidad por dosis única y por dosis repetida.

La sustancia a evaluar fue el AFCo1 a una concentración de proteínas de 1 mg/mL. La formulación de 100 µL de AFCo1, contenía además NaCl₂ (292 µg), Tris (360 µg), CaCl₂ (73,5 µg), tiomersal (1,0 µg), y agua para inyección como solvente. La formulación de placebo estuvo compuesta por los componentes auxiliares señalados previamente.

III.7.2.1 Diseño del estudio de toxicidad por dosis única

Diez ratas de cada sexo se inocularon con 50 µL por cada fosa nasal (la misma dosis propuesta en humanos). Los animales se examinaron clínicamente, a diario, prestando particular atención a la aparición de los siguientes signos: irritación y secreción nasal, estornudo, disnea, salivación, cambios conductuales y reacciones cutáneas. El peso de los animales se determinó al principio y final del periodo de adaptación y los días 3, 7 y 14 después de la inoculación. La ingestión de agua y alimentos se midió en días alternos para determinar el consumo promedio. Los animales se sacrificaron dos semanas después de la última inoculación y en los estudios anatomopatológicos se realizó un énfasis particular en la región nasal y el encéfalo. Se calculó el índice de irritación tomando como base el grado de edema y congestión, el estado del epitelio y el tipo de células inflamatorias infiltrantes de la mucosa nasal, según se ha descrito en las normativas (135).

III.7.2.2 Estudio de toxicidad por dosis repetida

Cuatro dosis de 100 µL totales de la sustancia a evaluar se administró por vía nasal cada 5 días. El esquema propuesto para uso humano está concebido para tres dosis solamente, pero se administró una dosis más en las ratas para maximizar su exposición a la

sustancia a prueba. De manera similar al estudio anterior (acápite III.7.2.1) se midieron los síntomas clínicos, el consumo de agua y alimento; y el peso corporal. Además, se realizaron estudios hematológicos, de bioquímica sanguínea y anatomopatológicos, tomándose muestras los días 3, 14 y 28 después de la última inoculación.

Los estudios hematológicos incluyeron el hematócrito, el conteo global de leucocitos y el conteo diferencial; los de bioquímica sanguínea estuvieron conformados por la determinación de glucosa, urea, creatinina, creatina fosfatoquinasa, fosfatasa alcalina, proteínas totales, colesterol, triglicéridos, ureatos, transaminasas y bilirrubina directa e indirecta. Para todas estas últimas determinaciones (hemoquímica), se emplearon estuches comerciales (CENTIS, La Habana, Cuba). Antes de procesar las muestras se llevó a cabo la calibración de las técnicas empleando reactivos de calibración (SPINTROL-CAL) y patrones de sueros con concentraciones normales (SPINTROL-NORMAL) y patológicas (SPINTROL-PATOLOGICO). Durante el proceso de análisis de las muestras se incluyó una muestra de referencia normal y una patológica por cada 10 muestras analizadas, con el objetivo de controlar el funcionamiento de las técnicas.

Los estudios anatomopatológicos incluyeron la necropsia del 100% de los animales y el muestreo para histopatología de los órganos que se relacionan a continuación: lengua, corazón, timo, pulmón, bazo, riñones. Se calculó el peso relativo de los órganos y el índice de irritación causado por el producto en la mucosa nasal.

III.8 Determinación de la capacidad adyuvante del AFCo1 frente antígenos no relacionados con el PL

La capacidad adyuvante del AFCo1 se evaluó mediante el efecto inmunomodulador e inmunopotenciador de estas estructuras sobre la respuesta inmune inducida frente a los

antígenos no relacionados con el PL como: OVA, péptido sintético TB (PepVac TB1) o proteína recombinante TB (TB1r) correspondientes a los epitopos T y B de *Streptococcus* hemolítico del grupo A (136). Los antígenos se mezclaron en una misma formulación con el coceleato obtenido por filtración tangencial en la planta de Desarrollo Farmacéutico del Instituto Finlay. A esta mezcla, la cual se administró de manera inmediata en ratones BALB/c por vía IN, se le denominó formulación adyuvada.

Se evaluó la respuesta inmune de anticuerpos inducida (IgG en suero e IgA anti-OVA en saliva, PepVac TB1, TB1r) 7, 14, 21 días después de la última dosis administrada. Adicionalmente, se estudió la composición de subclases de anticuerpos séricos (IgG1, IgG2a), la inducción de citocinas (14 días después de la última dosis) y la capacidad de linfoproliferación de las células.

III.8.1 AFCo1+Ovalbúmina bovina

En este estudio se inmunizaron ratones BALB/c con 3 dosis (cada 5 días) por vía IN (60 µg de proteínas totales (10 µg de OVA+ 50 de AFCo1). Como control positivo del experimento, se administraron 3 dosis de 10 µg de Ova en SSTF por vía IN. En estos animales se estudió la producción de anticuerpos específicos contra OVA o PL en suero (IgG) y saliva (IgA), a los 7 días después de la última dosis, respectivamente.

III.8.2 AFCo1+PepVac TB1 o TB1r

Para inducir respuesta inmune mucosal, se inmunizaron ratones BALB/c por vía IN con tres dosis (0, 5, 10 días) de PepVac TB1 (20 µg) y de proteína recombinante TB1r (40 µg) formulados ambos con AFCo1 (50 µg). Las inmunizaciones se realizaron con ayuda de micropipetas, administrándose 12,5 µL/fosa nasal. Se utilizaron como control negativo animales sin inmunizar y además AFCo1. Como control del experimento, se

administraron 3 dosis de PepVac TB1 (20 µg) o proteína recombinante TB1r (40 µg) diluidos en SSTF, según el caso, por vía IN.

III.8.3 Toma de muestra

Las muestras se colectaron según se describe en los acápites III.4.2.

III.8.4 Determinación de IgG (en suero) e IgA (en saliva) de ratón

Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante ELISA. Placas de 96 pozos (MaxiSorp, Nunc, Denmark) se recubrieron con una solución de 10 µg/mL de OVA, de 0,1 µg/mL de PepVac TB1 o proteína recombinante TB1r diluidas en solución tampón de recubrimiento (III.5). Las muestras de suero y controles a evaluar se diluyeron en dilución seriada a partir de 1:100 y las de saliva se diluyeron 1:10 en solución de bloqueo-Tween 20 0,1% (v/v), se realizaron dos réplicas de cada muestra. Se adicionó el conjugado, la solución reveladora y la solución de detención de la reacción para IgG e IgA como se describe en acápites III.5.1 y III.5.2, respectivamente. Los resultados de IgG se expresaron como el recíproco de la última dilución en la que las muestras fueron positivas y se calculó la media geométrica del título por grupo. Los resultados de IgA anti-TB1 se expresaron en DO, en este ensayo las muestras se consideran positivas por encima del valor 0,2 de DO.

III.8.5 Determinación de subclase de IgG anti-OVA, anti PepVac TB1 anti y antiTB1r (IgG1 o IgG2a)

Las placas se recubrieron con 10 µg/mL de OVA, 0,1 µg/mL de PepVac TB1 o proteína recombinante TB1r. Este ensayo se realizó según el procedimiento descrito en el acápites III.5.3.

III.8.6 Ensayo de inmunidad celular en ratones inmunizados con el péptido sintético PepVacTB1.

Quince días después de la última dosis, los animales se sacrificaron para la extracción del bazo con el objetivo de realizar los ensayos de evaluación de respuesta celular *in vitro*. Para ello ratones BALB/c se sacrificaron en cámara de CO₂ y los bazos se recolectaron. Las células se obtuvieron después de una maceración gentil de los mismos y se lavaron en 10 mL de medio RPMI-1640 suplementado con L-glutamina 2 mM (Sigma), solución de aminoácidos esenciales (1% v/v) (Gibco), piruvato de sodio 1 mM, 2-ME 5x10⁻⁵M (Sigma), y los antibióticos Gentamicina (40 µg/mL) y Peflacina (20 µg/mL) (GIBCO). Las células se centrifugaron a 9000 g por 6 min. a 4⁰C y se trataron con solución hemolítica estéril (NH₄Cl 0,15 M, KHCO₃ 1 mM, Na₂EDTA 0,1 mM, pH 7.2 - 7.4) a razón de 1 mL/bazo, durante 2 min. a TA. Una vez lisados los hematíes las células se lavaron 2 veces con medio RPMI-1640. Al final de los lavados las células se resuspendieron en RPMI completo (10% SBF, 1% L-Glutamina, y 1% Gentamicina como antibiótico), a razón de 1 mL/bazo de medio. Se realizó el conteo celular en cámara de Newbauer y se determinó la viabilidad mediante tinción de exclusión.

Ensayo de linfoproliferación

Para este fin, los esplenocitos recién aislados a una concentración de 5X10⁷ células/mL se resuspendieron en SSTF, se marcaron con 1,25 µM de Carboxyfluorescein Diacetate, Succinimidyl Ester (Molecular Probes) (CFSE) durante 10 min. a 37⁰C. Inmediatamente las muestras se centrifugaron a 1200 g por 6 min. y la reacción se detuvo con la adición de medio RPMI suplementado con 10% SBF. Después de dos lavados con medio RPMI,

las células se resuspendieron en este mismo medio a una concentración de $1,5 \times 10^6$ /mL. Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo en U (Nunc, EUA) a una concentración de 3×10^5 células por 200 μ L en presencia de medio RPMI, PepVacTB1 (10 μ g/mL) a 37°C, en atmósfera húmeda y 5% de CO₂ en incubadora (ASSAB, Suecia). Todos los cultivos se realizaron por triplicado y se incubaron durante 5 días.

Marcaje para citometría de flujo

Después de 5 días de cultivo, las muestras triplicadas se colectaron y se transfirieron a un solo pozo de otra placa de fondo en U (Nunc, EUA). La placa se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en un volumen final de 50 μ L de anticuerpos anti-CD3 PE, anti CD4a PerCP y anti-CD8 APC (Pharmigen, EUA) a una dilución de 1:200 en RPMI 10% Suero Fetal Bovino (SFB). La placa se incubó durante 45 min. en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 1000 rpm por 5 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con 200 μ L de PBS y se fijaron con 200 μ L de paraformaldeído 4% durante 5 min a TA. La placa se centrifugó a 1000 rpm por 5 min. a 4°C y las células se resuspendieron en 200 μ L de tampón de FACS (SSTF/2% SFB). Se leyó en citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson, EUA) utilizando-el software CellQuest Pro.

III.8.7 Determinación de IFN γ , IL-4 e IL-10

Después de 72h de incubación con el antígeno, 150 μ L de sobrenadante se recolectaron para la determinación de IFN γ , IL-4 e IL10. Placas de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc), se recubrieron con 50 μ L de anticuerpos de captura (Pharmingen, CA, EUA) a las siguientes diluciones de trabajo: 1,5 μ g/mL para anti-IFN γ (clone R4-6A2), 2 μ g/ml para anti-IL-4 (clone BVD4-1D11) y 1 μ g/mL para anti-IL-10 (clone JES5-2A5). Los

anticuerpos se diluyeron en tampón carbonato-bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 y se incubaron durante 16 h a 4°C. Después de ser lavadas con SSTF-0,05% Tween-20 (SSTF-T), la placa se bloqueó con SSTF-1% de ASB (SSTF-ASB) por 1 h a TA. Después del lavado se añadieron 50 µL de citocinas murinas recombinantes (curva patrón de 2000 pg/mL hasta 15,6 pg/mL, Pharmingen) y las muestras por duplicado. Se incubaron por 16 h a 4°C. Posteriormente, las placas se lavaron 5 veces con SSTF-T y se incubaron con 50 µL de anticuerpos específicos marcados con biotina (1µg/mL para anti-IFN γ , clone XMG1.2; 1µg/ml para anti-IL-4, clone BVD6-24G2 y 1 µg/mL para anti-IL-10, clone SXC-1, Pharmingen), por 1 hora a TA. Después de 5 lavados se adicionó estreptavidina conjugada con peroxidasa, diluida 1/1000. Se incubó por 45 min y se lavaron 5 veces con SSTF-T. Se añadieron 50 µL del cromógeno OPD (0,4 mg/mL) diluido en tampón citrato, pH 5,0 y 0,4 µl/mL de peróxido de hidrogeno y se incubó por 10 min. en la oscuridad. La reacción se detuvo con 50 µL de una solución de H₂SO₄ 4 N. La lectura se realizó en espectrofotómetro a una longitud de onda de 492 nm. Las concentraciones de las citocinas en la muestra se estimaron mediante la ecuación de ajuste de la curva patrón utilizada.

III.9 Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos de los estudios inmunoenzimáticos se utilizó el paquete de programas GraphPad Prism v 4.00 (GraphPad Software Inc. 2003). Los datos analizados en todos los casos se obtuvieron de al menos 3 experimentos independientes. La normalidad de los datos se comprobó mediante al prueba de Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Barlet. En los casos necesarios, de realizaron transformaciones de los datos hasta lograr normalidad. Las diferencias

significativas entre las medias fueron determinadas utilizando una prueba t “de student” o Turkey previa comprobación de diferencias entre los grupos mediante un análisis de varianza (ANOVA) de clasificación simple (137).

En el caso de la prueba de tolerancia local, para el análisis del peso corporal se utilizó una covarianza con mediciones repetidas con tres factores (tratamiento, sexo, tiempo). A consecuencia del sacrificio seriado, la N se redujo drásticamente desde 25 hasta 5.

Para realizar el análisis estadístico de las variables agua y alimento se realizaron observaciones en el tiempo. El objetivo de este proceder fue evitar incremento innecesario del error experimental. Se compararon consumo de agua y alimento mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento x sexo x tiempo).

En caso de aparecer lesiones, sus frecuencias se compararon mediante la prueba de χ^2 y la prueba exacta de Fisher.

En cuanto a la toxicidad por dosis única y repetida, los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos desde el punto de vista estadístico, excepto la verificación de la aleatorización de los animales en las cajas, donde se tomaron como significativos los valores inferiores a 0,1.

La normalidad y la homogeneidad de varianza se evaluaron por medio de la prueba ShapiroWilk's W y prueba Levene's respectivamente, en orden de decidir la conducta paramétrica (análisis de varianza y la prueba de diferencias significativas mínimas) o procedimiento no paramétrico (Kruskal Wallis y comparación múltiple de distribución libre). Finalmente la proporción de cambios histológicos se comparó mediante el análisis de log- lineal.

IV. RESULTADOS

IV.1 Determinación de las condiciones óptimas de Filtración tangencial

Para el diseño de los procesos de FT con fibra hueca se tuvo en cuenta la experiencia previa existente en el laboratorio con FT con membrana plana (59). En el primer proceso realizado de FT con fibra hueca (P-08-Co/B) se trabajó con una presión en la alimentación de 0,5 bar (Tabla 7). En estas condiciones se incrementó considerablemente el flujo de filtrado, disminuyendo el tiempo de filtración en la etapa de formación y lavado de los cocleatos. Las diafiltraciones se realizaron en un tiempo entre 16 - 30 minutos, lo cual implicó la no formación de cocleatos. El tiempo de diafiltración se incrementó disminuyendo la presión en el retorno a 0,1 bar en la etapa de formación de los cocleatos (4 primeros lavados).

Posteriormente en el proceso P-09-Co/B, se utilizó una presión de 0,2 bar (presión de retorno) para los lavados encaminados a la eliminación de los cristales de calcio. En este proceso se incrementó la concentración de CaCl_2 a 3 mM y el número de lavados con el TF a 4 para favorecer la obtención de los cocleatos con relación al proceso previo (P-08-Co/B). La concentración de CaCl_2 en el TL se mantuvo en 2 mM con 6 lavados. Los resultados mostraron la formación de estructuras cocleares, no obstante, durante los lavados con la solución de 2 mM de CaCl_2 , estos se desenrollaron formándose agregados proteicos. Hubo un aumento además en el tiempo de lavado (Tabla 8).

En el proceso P-10-Co/B se incrementó la concentración de CaCl_2 hasta 4 mM en el TF (4 lavados), mientras que en el TL siguiente, se utilizó una concentración de 3 mM (6 lavados). En este caso se obtuvieron estructuras cocleares, aunque en el análisis

microscópico de las muestras tomadas, también se observaron algunos agregados de proteína (Tabla 9).

El proceso P-11-Co/B fue similar al P-10-Co/B, en el mismo sólo se varió la concentración de DOC (1,0%). Se detectó la formación del precipitado blanquecino, pero también se observaron algunos cristales en el producto final. El comportamiento del flujo de filtrado y la concentración de proteínas fue similar al proceso anterior y además se observó similar comportamiento en los procesos siguientes. Los lavados para eliminar los cristales de calcio, tampoco fueron totalmente efectivos, permaneciendo algunos de ellos en el producto. (Tabla 10).

Finalmente, en los procesos P-12-Co/B y P-13-Co/B se evaluaron dos estrategias para la eliminación de los cristales de calcio, una, la disminución del flujo de filtrado (proceso P-12-Co/B, Tabla 11) y la otra, el incremento del número de lavados (proceso P-13-Co/B, Tabla 12), hasta un total de 12 volúmenes de diafiltrado. Los resultados de estos dos procesos fueron muy similares, aunque el producto obtenido en el proceso P-13-Co/B se caracterizó por la presencia de gran número de estructuras cocleares, muy pocos cristales y disminuyó la concentración de DOC en la suspensión; además no fue un proceso continuo. En este último proceso el reservorio en etapa de formación se almacenó durante toda la noche, para posteriormente comenzar con la etapa de lavado. Los procesos P-14-Co/B, P-15-Co/B, P-16-Co/B se realizaron en las mismas condiciones que el P-13-Co/B.

IV.1.1 Comportamiento hidrodinámico

El comportamiento hidrodinámico del proceso de diafiltración por fibra hueca, desde el comienzo en la etapa de formación el flujo de filtrado prácticamente entra en un estado

estacionario, con una ligera tendencia al incremento de su valor (Figura 2). En la segunda etapa el flujo comenzó alto.

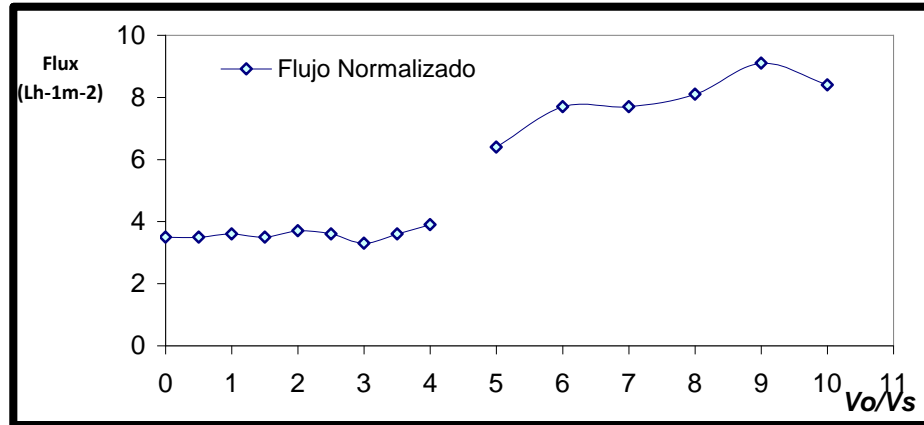


Figura 2. Comportamiento hidrodinámico del sistema de filtración tangencial con fibra hueca (P-13-Co/B), en la formación y lavado de los coqueatos.

Se determinó en el reservorio la concentración de proteínas en la solución, la cuál coincidió con la de la suspensión, mientras que en el precipitado se detectaron insignificantes concentraciones de éstas. Después del primer lavado se observó un incremento drástico de las proteínas presentes en el precipitado de forma simultánea con la disminución de éstas en la solución. Posteriormente, el contenido de proteínas en el precipitado se estabilizó a valores altos durante el resto del proceso, incluyendo la etapa de lavado final, coincidiendo con la concentración de proteínas de la suspensión (Figura 3).

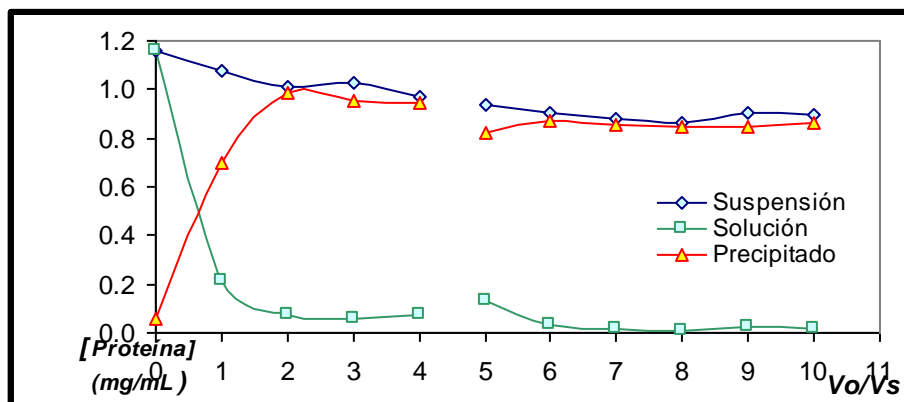


Figura 3. Comportamiento de la concentración de proteínas en el reservorio durante la filtración tangencial con fibra hueca (P-13-Co/B), en la formación y lavado de los cocleatos.

En la Figura 4 se muestran los rendimientos con relación a la cantidad de proteínas y Flps en los diferentes procesos. Se obtuvo un recobrado superior al 80%. Con relación a la cantidad de Flps presentes, se observó correspondencia con la concentración de proteínas, sugiriendo que estos se encuentran formando las estructuras cocleares asociados a la membrana lipídica. Como era de esperar este comportamiento se observó en todos los procesos evaluados (Tabla 13).

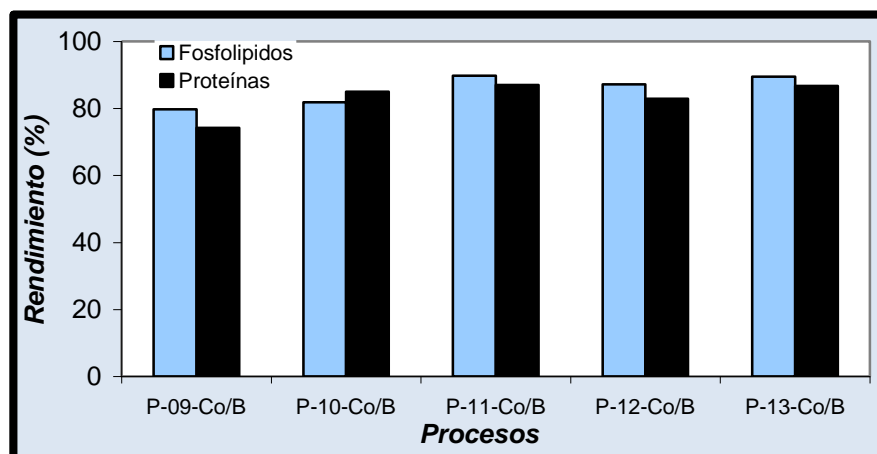


Figura 4. Rendimientos en relación a la cantidad de proteínas y fosfolípidos obtenidos en diferentes procesos.

Adicionalmente, se determinó el contenido de DOC durante todo el proceso (resultados no mostrados). En el desarrollo de esta determinación se detectó interferencia de los iones Ca^{2+} con el método de determinación de este detergente no mostrando el comportamiento esperado. No obstante, se logró conocer la concentración en el producto final encontrándose por debajo de los límites aceptados en los productos farmacéuticos ($\leq 2 \mu\text{g}$ por cada $50 \mu\text{g}$ de proteínas, 4%) que se analizan en los laboratorios de la Dirección de la Calidad del Instituto Finlay.

Las condiciones con las que se realizó el P-13-Co/B, resultaron ser las más eficientes de todas las evaluadas en cuanto a consistencia de los parámetros operacionales, condiciones de proceso y composición de los tampones empleados (Tabla 14, 15, dorso página 57).

IV.2 Caracterización de las estructuras cocleares

Se caracterizaron las estructuras cocleares obtenidas como resultado del proceso P-13-Co/B, según sus características morfológicas y funcionales.

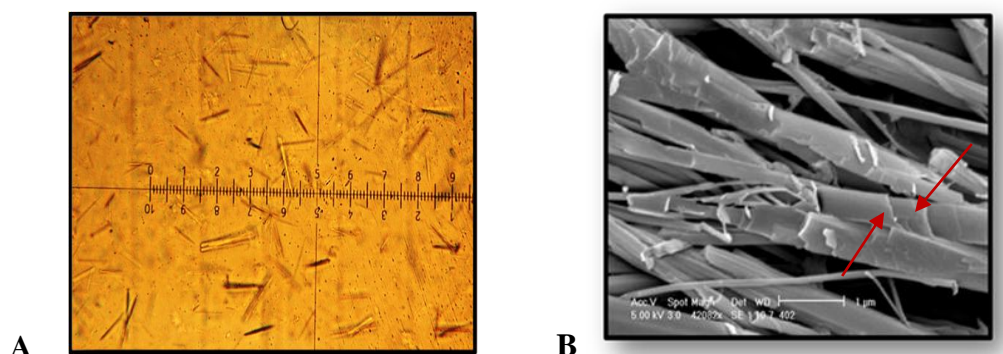
IV.2.1 Determinación de la forma y tamaño de las estructuras cocleares.

Microscopía óptica

La Figura 5A muestra una microfotografía de microscopía óptica con contraste de fase de estructuras cocleares obtenidas por filtración tangencial (FT) en el proceso P-13-Co/B. Predominaron las estructuras tubulares, alargadas de un tamaño promedio (200 partículas) de $11,6 \pm 3,7 \mu\text{m}$ de largo, determinado mediante el empleo de una escala graduada acoplada a la lente objetivo, como puede observarse en la figura.

IV.2.2 Microscopía electrónica de barrido

El análisis por MEB de las estructuras cocleares obtenidas en el proceso P-13-Co/B, confirman la forma alargada y tubular de las micro-estructuras, formadas por múltiples capas, dispuestas unas sobre otras Figura 5B.



Figuras 5. *Microfotografías donde se pueden observar estructuras cocleares obtenidas mediante el proceso de FT. En A. se observan mediante microscopía óptica, estructuras tubulares, alargadas. En B se observa mediante MEB, las múltiples capas (flechas) que conforman las estructuras tubulares obtenidas, cuando se superponen una sobre otra.*

IV.2.3. Identidad de las estructuras cocleares

Se realizó un estudio comparativo de los perfiles de proteína del PL y el AFCo1 mediante SDS-PAGE (Figura 6), se determinó que los mismos no experimentaban modificaciones, mediante el reconocimiento de las proteínas presentes en el PL y el AFCo1, mediante el uso de sueros (mezcla) de individuos vacunados con VAMENGOC-BC®, mediante el método de inmunotransferencia (Figura 7).

IV.2.3.1 Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%.

En la Figura 6 A puede observarse un gel de poliacrilamida al 12,5%, en el cual se muestra el perfil de proteínas de los diferentes procesos. Para determinar la correlación

existente entre las bandas de proteínas resultantes de los productos de los diferentes procesos y aquellas presentes en el PL, se empleó el paquete de programas ImageMaster 1D (Figura 6 B).

Como puede apreciarse existió una correlación superior al 80% entre las bandas correspondientes a los procesos realizados con FT con fibra hueca y aquellas del PL, tanto en el número de bandas presentes, como en la intensidad de las mismas. Esta correlación alcanzó su valor máximo con el producto resultante del proceso P-13-Co/B (96,0%), valor contrastante con los porcentajes obtenidos a partir de los productos de los procesos de FT realizados con la configuración de membrana plana (P-7Co/B), nunca superiores a un 25,0%.

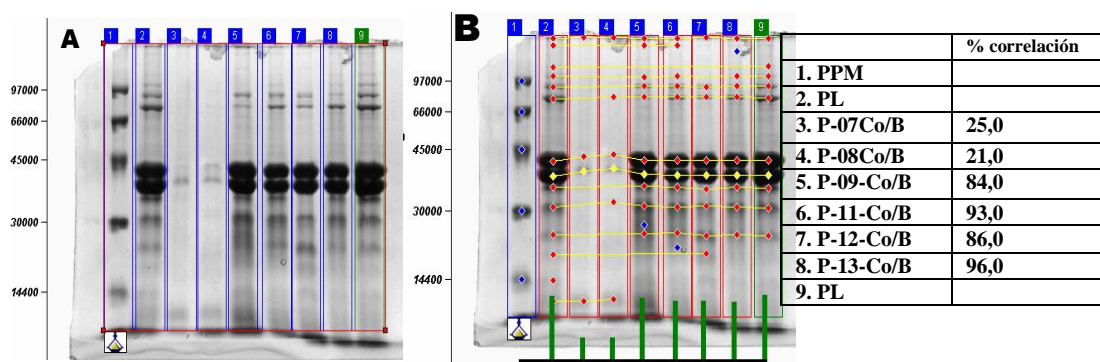


Figura 6. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5%. A. Gel teñido con azul Coomassie. B. Resultado del análisis de identidad realizado por el paquete de programas ImageMaster 1D. El recuadro muestra los porcentajes de correlación de la composición proteica de los cocleatos con el Proteoliposoma de *N. meningitidis B* a partir del cual se obtienen.

IV.2.3.2 Inmunotransferencia

En la Figura 7 se muestra el patrón de reconocimiento de los productos obtenidos por FT con fibra hueca, por los sueros de individuos inmunizados con VA-MENGOC-BC®, el cual es similar al observado con el Proteoliposoma. Sin embargo, en aquellos productos

obtenidos con la configuración de membrana plana, no se observan las proteínas de bajo peso molecular.

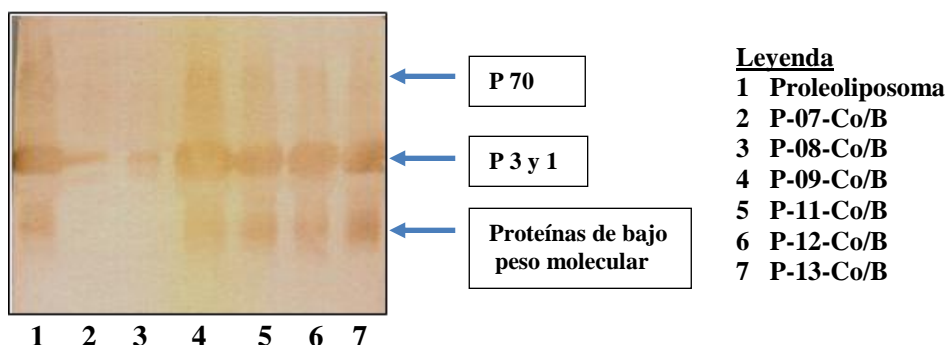


Figura 7. *Inmunotransferencia. Patrón de reconocimiento antigénico de las proteínas presentes en el Proteoliposoma y en las muestras de cocleatos de los diferentes procesos; por sueros (mezcla) de individuos inmunizados con VA-MENGOC-BC®.*

IV. 3 Inmunogenicidad

IV.3.1 Determinación de Ac IgG anti proteoliposoma

Se evaluó la capacidad de los cocleatos de inducir en el suero de los animales inmunizados IgG sistémica anti-PL, cuando se administraban por vía IM e IN. La Figura 8 muestra las medias y las desviaciones estándar de 2 determinaciones en 3 experimentos independientes. Puede apreciarse que los niveles de IgG anti- PL en los ratones inmunizados con AFCo1 por vía IN difirió de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$), de los niveles de IgG específica observados en el suero del grupo control al que se administró tampón Tris- Ca^{2+} .

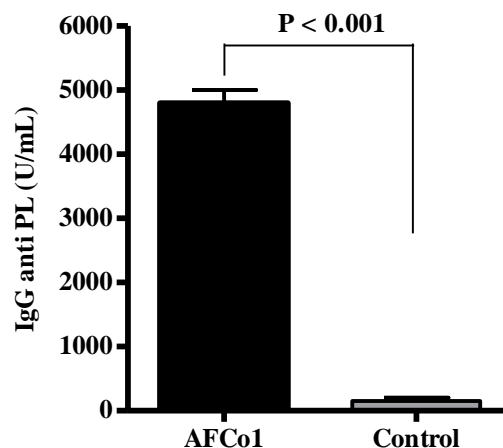


Figura 8. Respuesta de IgG anti PL en suero, inducida por el AFCo1 aplicado por vía IN. R ratones BALB/c fueron inmunizados por vía IN (50 µg de proteína). Se determinaron los niveles de IgG en suero contra el PL mediante un ELISA, 21 días después de la última inmunización. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 2 determinaciones en 3 experimentos independientes. Las diferencias entre la medias se evaluaron por la prueba t de “student”, $p < 0,001$.

IV.3.2 Determinación de Ac IgA anti proteoliposoma

Se evaluó también la respuesta de IgA a nivel secreción (saliva) de mucosa en los ratones inmunizados por vía IN, como se ha descrito previamente. Puede apreciarse en la Figura 9 que en ratones inmunizados por esta vía, se lograron niveles de IgA superiores a 2000 UA/mL, contrario a los niveles observados en el grupo control, inferiores a 250 UA/mL, siendo la diferencia encontrada estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

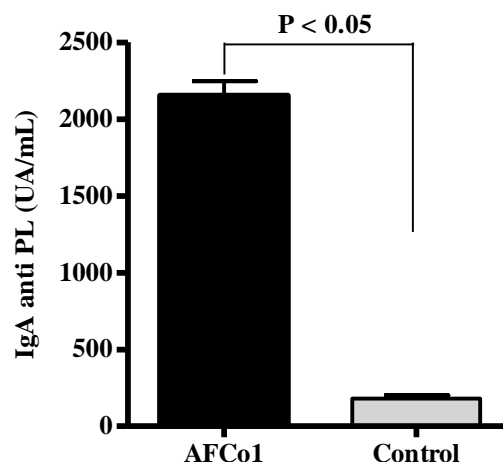


Figura 9. Respuesta de IgA anti PL inducida por la inmunización con el AFCo1 por vías IN. Ratones BALB/c fueron inmunizados por vía IN (y 50 μ g de proteína). Se determinaron los niveles de IgA anti PL en muestras de saliva, se consideraron positivas las muestras por encima de 250 UA/mL. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 2 determinaciones en 3 experimentos independientes. Las diferencias entre la medias se evaluaron por la prueba de t de “student”, $p < 0,05$.

IV.3.3 Determinación de subclases de IgG anti-proteoliposoma

Para evaluar el tipo de respuesta inducida por el AFCo1, obtenido en las condiciones previamente mostradas, se determinó la composición de subclases en el suero. A través de la inmunización por vía IN en ratones BALB/c se obtuvo niveles de IgG1 e IgG2a anti-PL, superiores al grupo control (grupo inmunizado con tampón Tris- Ca^2). Por otra parte, se observó una inducción superior de IgG2a con relación a IgG1, sugiriendo una inducción preferencial de IgG2a. Los resultados demuestran que el AFCo1 induce un patrón de subclases de IgG, compatible con una polarización de la respuesta a Th1 (Figura 10).

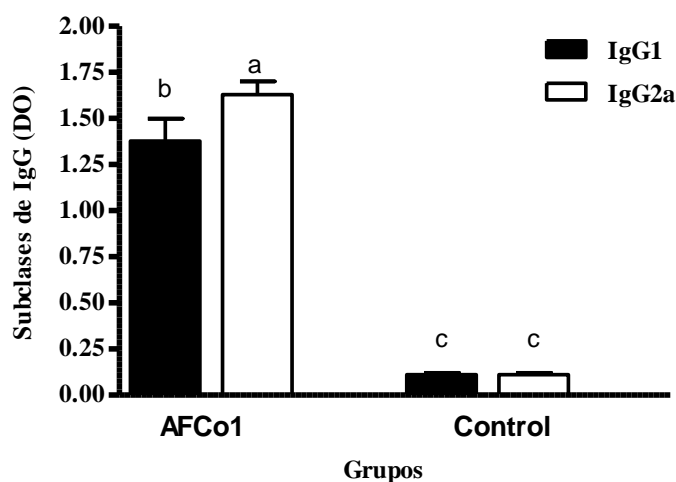


Figura 10. Determinación de las subclases IgG1 e IgG2a anti PL en suero inducidas por AFCo1, administrado por vía IN. Para la determinación de las subclases producidas, se emplearon muestras de suero de ratones BALB/c inmunizados por vía IN 50 μ g de proteína, tomadas a los 21 días posterior a la última inmunización. Se muestran las medias y las desviaciones estándar de 2 determinaciones en 3 experimentos independientes (Prueba de Tukey $p < 0,05$).

IV.3.4 Determinación de IFN γ e IL-5

La Figura 11 muestra la producción de IFN γ por los esplenocitos de los ratones inmunizados con los esquemas previamente descritos, cultivados en presencia de PL (3 μ g/mL). Se puede observar los niveles de citocinas liberados por células procedentes de animales inmunizados por vía IN, corroborando el resultado anterior). La producción de IFN γ por las células de los ratones inmunizados por vía nasal, también difirió significativamente de la producida por las células de los controles ($p < 0,05$).

Otro aspecto que confirma un patrón de respuesta con predominio Th1, puede ser la no detección de IL-5 en los sobrenadantes de las células de los ratones inmunizados con AFCo1 por vía IN.

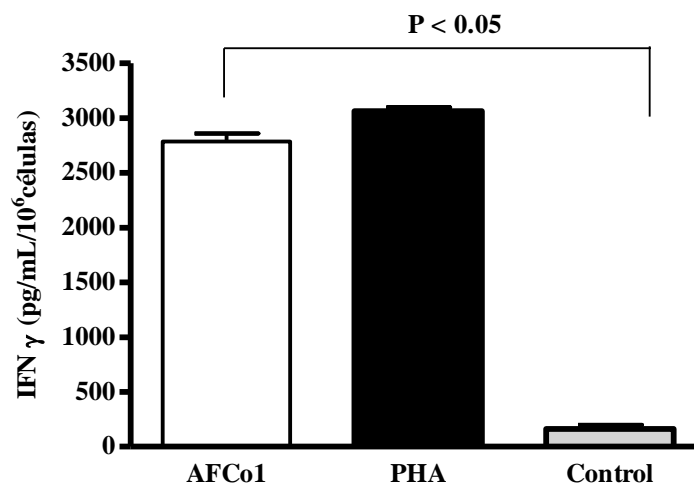


Figura 11. Producción de IFN γ por células de bazo re-estimulados *in vitro* con Cocleato (AFCo1). Las células de bazo fueron aisladas de ratones inmunizados con PL (vía IN) y fueron cultivadas en presencia de PL (3 μ g/mL). Como control positivo se usó PHA. Los niveles de IFN γ producidos fueron determinados mediante un ELISA cuantitativo a las 72 h. Se muestran la media y la desviación estándar de los niveles detectados en 3 experimentos independientes. La prueba de prueba t de “student” se utilizó para el análisis de los datos, $p < 0,05$.

IV.3.5 Prueba de Hipersensibilidad retardada

Se comprobó la funcionalidad *in vitro* de los clones Th1 activados como producto de la inmunización, mediante la capacidad de estos clones de generar procesos inflamatorios que median las reacciones de HR frente a un nuevo reto antigénico. La inducción de HR se determinó a las 48 h, tiempo en el cual se midió el volumen de la induración causada usando un plestimómetro automático. Los ratones desafiados con PL, e indujeron reacciones inflamatorias elevadas con respecto al grupo control, se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) (Figura 12).

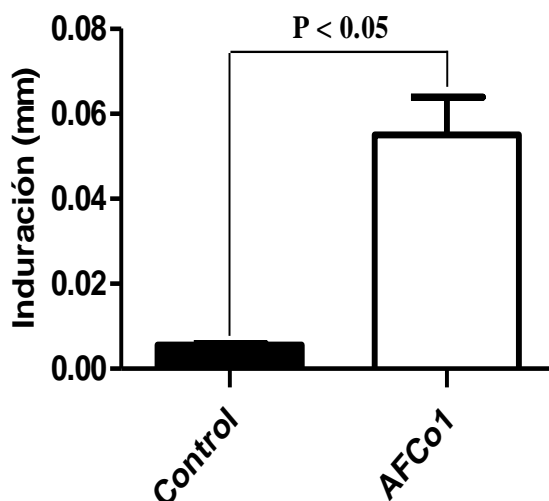


Figura 12. *Reacción de hipersensibilidad retardada inducida en ratones BALB/c por inmunización con cocleatos. Ratones BALB/c fueron inmunizados (2 dosis intramusculares de 12,5 μ g cada uno) y 7 días después fueron desafiados con 50 μ g de PL por vía intradérmica en la región dorsal de la extremidad posterior izquierda. Como control negativo se usó solución salina en la otra extremidad. El volumen de cada extremidad fue medido a las 48 h después del desafío usando un plestimómetro automático y la induración inducida fue determinada restando los volúmenes de la extremidad izquierda y derecha. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), la prueba *t* de “student” se utilizó para el análisis de los datos.*

IV.4 Estabilidad preliminar de los cocleatos obtenidos por FT

El período de validez en las condiciones de almacenamiento de los productos vacunales se definen a través de los estudios de estabilidad. La Tabla 16 resume los resultados de un estudio de estabilidad preliminar de los lotes 602 y 603 producidos en condiciones de escala piloto almacenados a 2–8°C y 30±2°C durante 12 meses, de acuerdo a las condiciones establecidas en el proceso P-13-Co/B. Los resultados de estos estudios en su totalidad cumplieron con los límites de aceptación y rangos que fueron propuestos. El estudio de estabilidad en vida estante y estudio acelerado planificados, cumplieron con los parámetros establecidos (Tabla 16), en cuanto a: tamaño (Figura 13) forma,

apariencia (Figura 14), pH, concentración de calcio libre, concentración de proteínas, preservo, identidad, límite microbiano, efectividad del preservo e inducción de respuesta de IgG anti-PL.

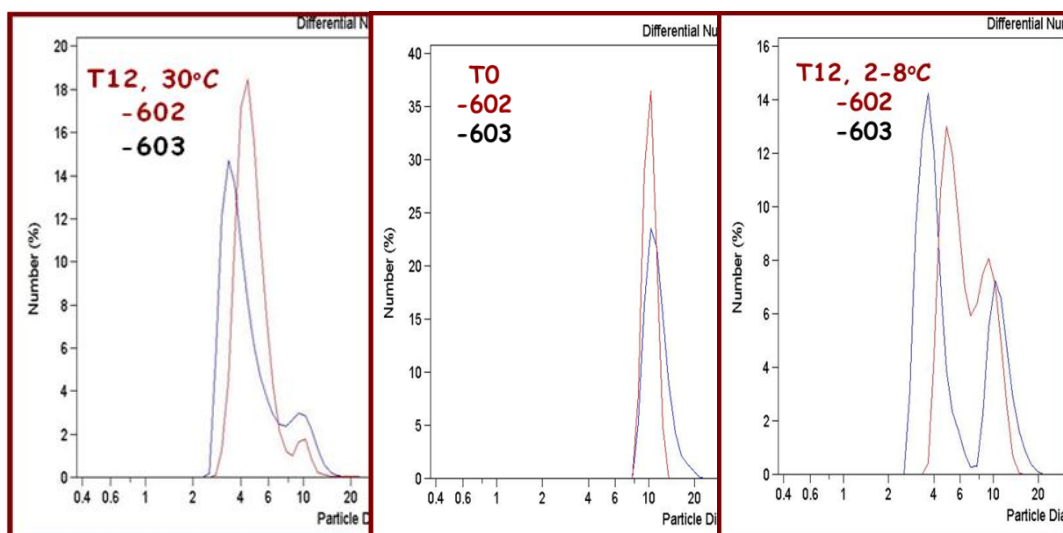


Figura 13. Tamaño de partículas determinado por Difractometría láser: 1 en T12 a 30±2, 2 en T0, 3 en T12 a 2-8°C



A

B

Figura 14. Apariencia de la suspensión obtenida por el proceso de filtración tangencial. En **A** se observa la formación de una suspensión blanquecina luego de la interacción del Ca^{2+} con el Proteoliposoma (fracción AFCo1 tot). **B**: se observa como las partículas sedimentan espontáneamente luego de 1-2 h. Las fotografías pertenecen al proceso 602.

IV 5 Estudios de toxicidad

IV.5.1 Ensayos de tolerancia local

Durante el ensayo no se observaron en las ratas síntomas clínicos tales como secreciones nasales, disnea, cambios conductuales, ni otras que evidenciaran compromiso del sistema respiratorio. Su comportamiento en general fue el esperado para esta especie, línea y edad.

Los consumos de agua y los alimentos de las ratas a los 7 días en que fueron determinados, arrojaron que los machos mostraron un consumo mayor que en las hembras, de manera constante. (Figuras 15, 16).

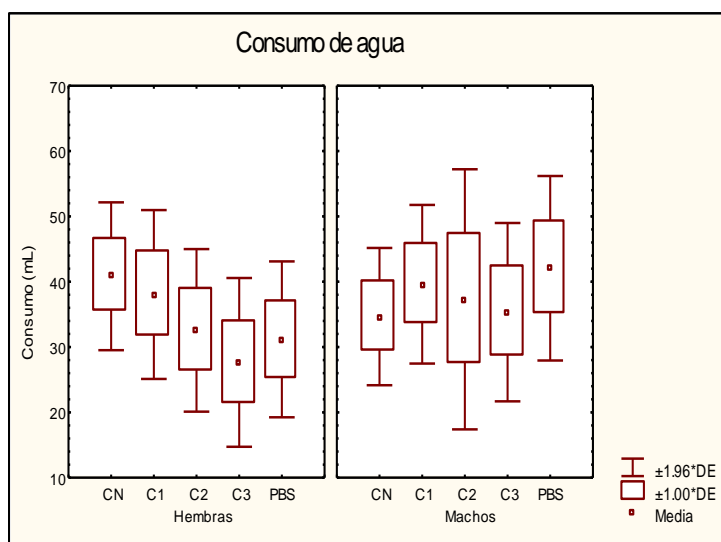


Figura 15: Se observa el consumo de agua a los 7 días post-inoculación.

*Leyenda : CN- Grupo I (Control negativo); C1- Grupo II (AFCo*1 50 µg); C2 – Grupo III (AFCo1 100 µg); C3- Grupo IV (AFCo1 200 µg); PBS- Grupo V(Control negativo).*

Se realizaron observaciones en el tiempo. Se compararon los consumos mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento x sexo x edad).

En la figura 16 se pudo observar el comportamiento de consumo de los alimentos, el cual tiende a incrementarse pasada la semana de inoculación.

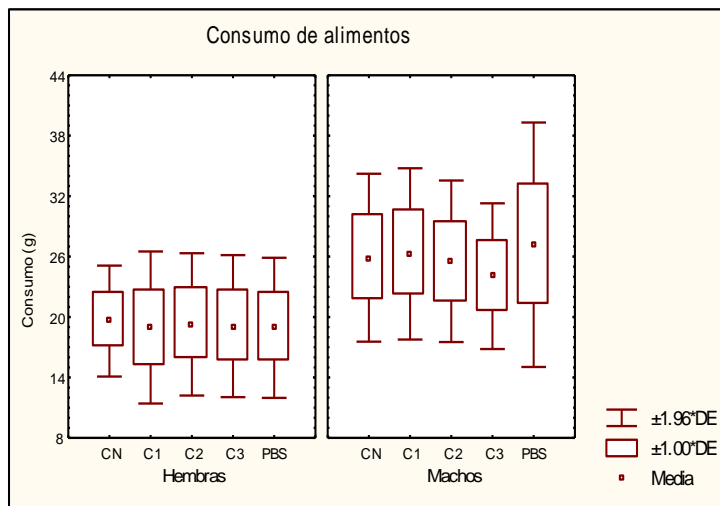


Figura 16: Se observa el consumo de alimentos a los 7 días post-inoculación.

Leyenda : CN- Grupo I (Control negativo); C1- Grupo II (AFCo*1 50 µg); C2 – Grupo III (AFCo1 100 µg); C3- Grupo IV (AFCo1 200 µg); PBS- Grupo V(Control negativo).

Se realizaron observaciones en el tiempo. Se compararon los consumos mediante análisis de varianza de clasificación triple (tratamiento x sexo x edad).

En cuanto al peso de los animales se puede observar Figuras 17 y 18 que la estadística de los pesos en las ratas durante los distintos momentos en que se midieron, arrojó que no existieron diferencias estadísticas que no fueran las esperadas de acuerdo al sexo, todos los animales incrementaron el peso corporal a lo largo del ensayo, siendo los machos los que mostraron un ritmo de crecimiento mayor que las hembras, normales para la línea y especie.

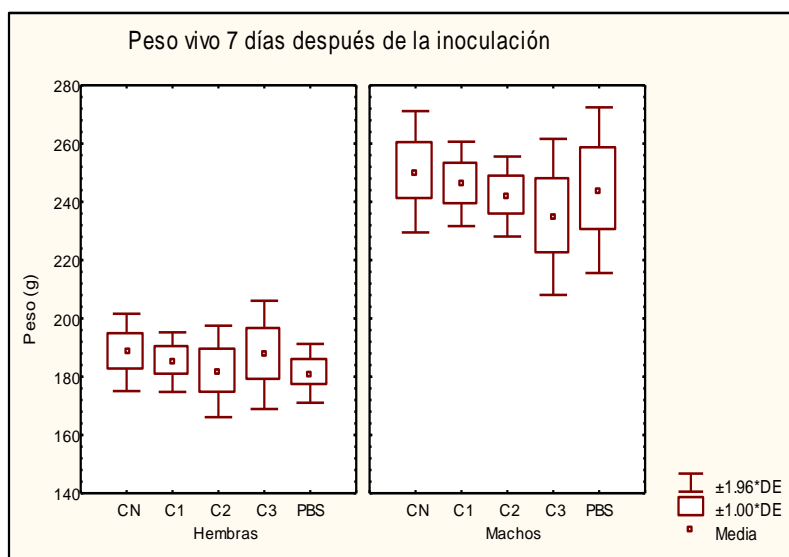


Figura 17: Peso de los animales vivos a los 7 días post-inoculación.

Leyenda : CN- Grupo I (Control negativo); C1- Grupo II (AFCo*1 50 µg); C2 – Grupo III (AFCo1 100 µg); C3- Grupo IV (AFCo1 200 µg); PBS- Grupo V(Control negativo).

Análisis de covarianza con mediciones repetidas con 3 factores (tratamiento, sexo, tiempo)

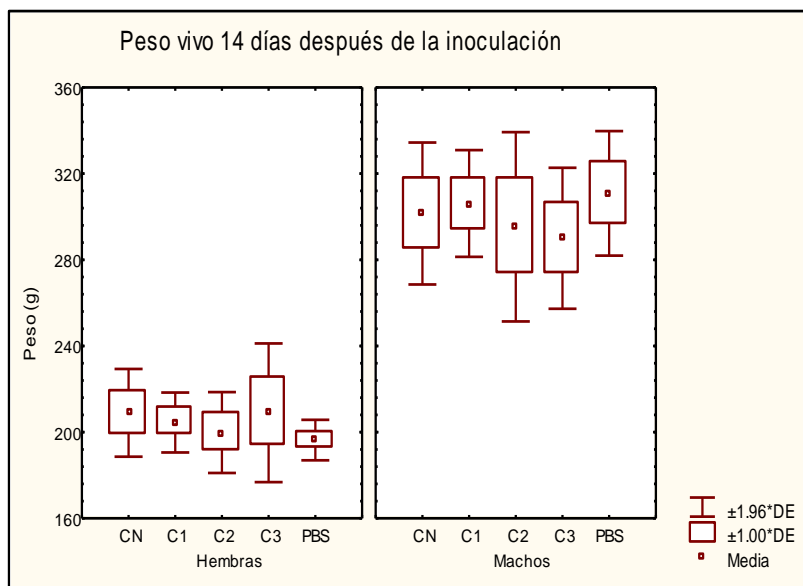


Figura 18: *Peso de los animales vivos a los 14 días post-inoculación.*

Leyenda : CN- Grupo I (Control negativo); C1- Grupo II (AFCo1 50 µg); C2 – Grupo III (AFCo1 100 µg); C3- Grupo IV (AFCo1 200 µg); PBS- Grupo V(Control negativo).

Análisis de covarianza con mediciones repetidas con 3 factores (tratamiento, sexo, tiempo)

Ninguno de los animales en el ensayo mostró alteraciones anatomopatológicas importantes. No obstante, en las muestras de tejido del sitio de inoculación investigadas histopatológicamente a los tres niveles de las fosas nasales de todos los animales, se apreció que en los animales del grupo control sin inocular y el placebo, se presentaron discretos focos de inflamación con escasa significación patológica, mientras que en los grupos experimentales se demostró la presencia de procesos inflamatorios moderados con presencia de Polimorfos nucleares neutrófilos (PMN) que se situaban a nivel de la lámina propia fundamentalmente en la zona media y posterior de las fosas nasales con cierto incremento de su presentación en dependencia del aumento en la concentración de los cocleatos inoculados por la vía nasal, (Tabla 17), (Figura 19), así como agregados de células linfoides a nivel de dicha lámina.

Tabla 17. Lesiones histo-patológicas en las ratas de ambos sexos inoculadas con diferentes concentraciones de cocleatos y sus controles.

Grupo	Tto	12 días						17 días						Total	
		Machos			Hembras			Machos			Hembras				
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3		
I	Control	-	-	-	+ M	+ M	-	-	-	-	-	-	-	-	2
II	AFCo1 50µg	-	-	+ P	-	-	-	+ P	+P	-	-	-	-	3	
III	AFCo1 100 µg	-	-	-	-	-	+ MP	++ P	-	+P	-	+P	+P	5	
IV	AFCo1 200 µg	++ MP	+ M	-	-	-	-	+P	+ MP	++ MP	-	-	-	5	
V	Diluyente	-	+ MP	-	-	+M	-	-	-	-	-	-	-	2	

Fosas nasales M: Parte media; P: Parte posterior; +: Leve; ++: Moderada;

-: Negativo

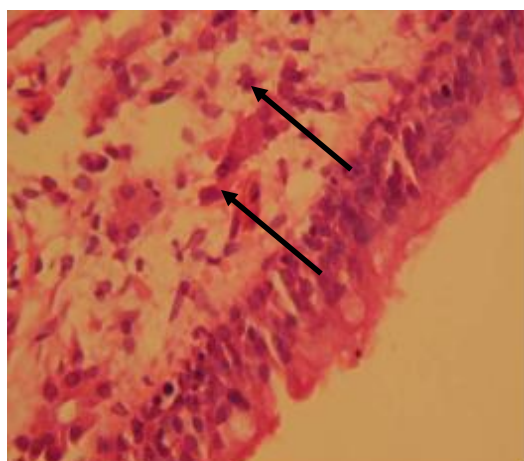


Figura 19. *Proceso inflamatorio moderado con la presencia de células polimorfas nucleares neutrófilos en la lámina propia de la mucosa a nivel de un cornete nasal del corte de la zona posterior (las flechas muestra los PMN), perteneciente a un animal inoculado con una concentración de 200 µg de cocleatos. H.E X 100.*

Los estudios microscópicos del sistema ervioso (SNC) central no mostraron alteraciones que evidenciaran el compromiso de este sistema debido a la utilización del producto a través de la vía nasal (datos no mostrados).

IV.5.2 Ensayos de toxicidad por dosis única y dosis repetida

En la prueba de toxicidad por dosis única así como en el estudio de toxicidad por dosis repetida todos los animales aumentaron su peso corporal, después de la inoculación de la sustancia prueba, sin embargo, las variaciones observadas entre los grupos experimentales en la toma de agua y alimentos fueron pocas. En general, las ratas machos consumieron más agua y alimentos que las hembras. El promedio diario del consumo de alimento fue de 19,3 g para las hembras y 25,6 g para los machos. De manera similar el promedio del agua consumido fue de 30 mL para las hembras y 41,9 mL para los machos. Ningún síntoma clínico local o general fue observado en ninguna de las dos pruebas de toxicidad realizadas.

IV.5.2.1 Estudio anatomo-patológico de toxicidad por dosis única

En la necropsia, se observó de forma esporádica congestión y pequeñas hemorragias en las glándulas parótidas y en los nódulos cervicales, retrofaríngeos y submaxilares. En el análisis histopatológico también se encontraron estas alteraciones en todos los grupos, con una frecuencia similar ($p > 0,1$) (Tabla 18). El índice de irritabilidad determinado a partir de los cambios encontrados en la mucosa nasal como consecuencia de la aplicación de una sola dosis de AFCo1 y placebo fueron todos inferiores a 1, por lo que se concluyó que el producto evaluado clasificaba como no irritante (Tabla 19).

IV.5.2.2 Estudio anatomo-patológico de toxicidad por dosis repetida

Los resultados de hematología y bioquímica sanguínea no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales ($p > 0,06$) (Tabla 20). Los pesos relativos de los órganos fueron estadísticamente similares (datos no mostrados), con excepción del peso del riñón derecho de las ratas hembras que recibieron el

tratamiento con AFCo1 y el placebo que fue más alto con relación al control. Sin embargo, no se encontraron cambios histológicos en los riñones de animales que sostuvieran una asociación con los efectos tóxicos.

Se observaron también hemorragias petequiales en los ganglios de la faringe y región cervical independientes del sexo, momento del sacrificio o grupo experimental asociado con la restricción del animal. En el estudio histológico se observó infiltración de células inflamatorias (macrófagos, linfocitos) de la cavidad nasal. Células mononucleares y esporádicos focos supurados se encontraron en tejidos de mucosa y de la submucosa en la región nasal, así como en los cornetes nasales dorsales y ventrales. Se encontró además congestión nasal, edema y degeneración en el epitelio superficial. Sin embargo, no se encontró diferencias estadísticas significativas entre los grupos tratados y el control (Tabla 21). El índice de irritabilidad obtenido (menor que 1) permitió clasificar la sustancia evaluada como no irritante (Tabla 22).

IV.6 Determinación de la capacidad adyuvante del AFCo1 frente antígenos no relacionados con el PL.

Para sustentar el uso del AFCo1 como adyuvante contra antígenos no relacionados con el PL, se procedió a la formulación de los antígenos OVA, TB1 y TB1r con estas estructuras cocleares (formulación adyuvada). Para desarrollar este objetivo se determinó la respuesta de anticuerpos (IgG y subclases de IgG e IgA anti-OVA, anti-PepVac TB1 y anti anti-TB1r); producción de citoquinas inducida por los grupos inmunizados con el AFCo1 y los diferentes antígenos en ratones BALB/c, administradas estas formulaciones por vía IN.

IV.6.1 Respuestas de Ac IgG anti-OVA, anti PepVac TB1 y anti-TB1r sérica

Como puede observarse en la Figura 20 hubo un marcado efecto adyuvante del AFCo1 cuando se formuló con OVA, TB1 y TB1r, evidenciado en la mayor respuesta de anticuerpo contra los antígenos estudiados cuando estos eran administrados con el adyuvante, con relación al control (administración del antígeno sólo), siendo las diferencias encontradas en los tres casos fué estadísticamente significativas.

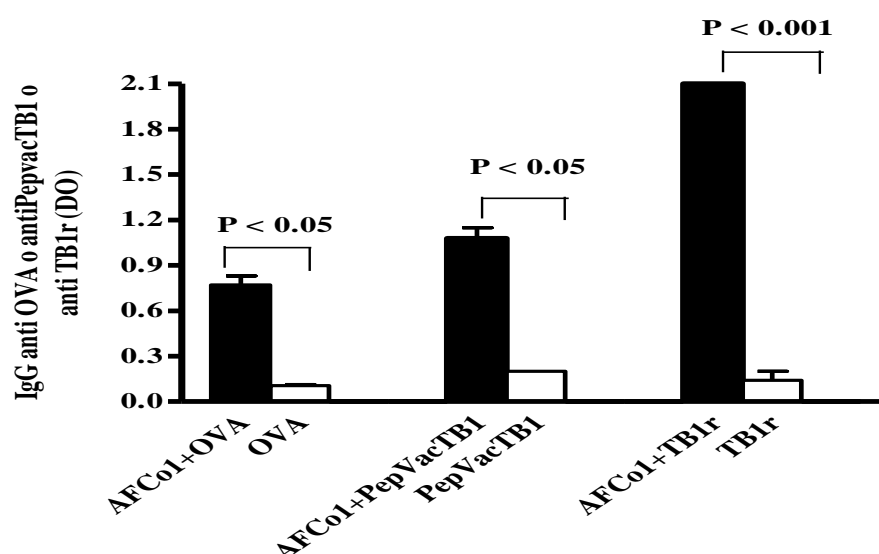


Figura 20. Respuestas de IgG anti OVA, anti PepVac TB1 anti y anti TB1r sérica inducida por la inmunización por vía IN con AFCo1+OVA (60 µg+10 µg), AFCo1+PepVac TB1 (50 µg+ 10 µg) y AFCo1+TB1r (50 µg+20 µg). Se determinó las respuestas de anticuerpos 7 días después de la tercera dosis. Se muestran las medias geométricas y las desviaciones estándar de 2 determinaciones en 3 experimentos independientes con resultados similares. (prueba t de "student p<0,05).

IV.6.2 Respuestas de Ac IgA en saliva anti-OVA, anti PepVac TB1

Se observó una mayor respuesta de IgA específica cuando el antígeno se administró con el adyuvante, con relación a la administración del antígeno solo y la diferencia encontrada en ambos casos fue estadísticamente significativa. (Figura 21).

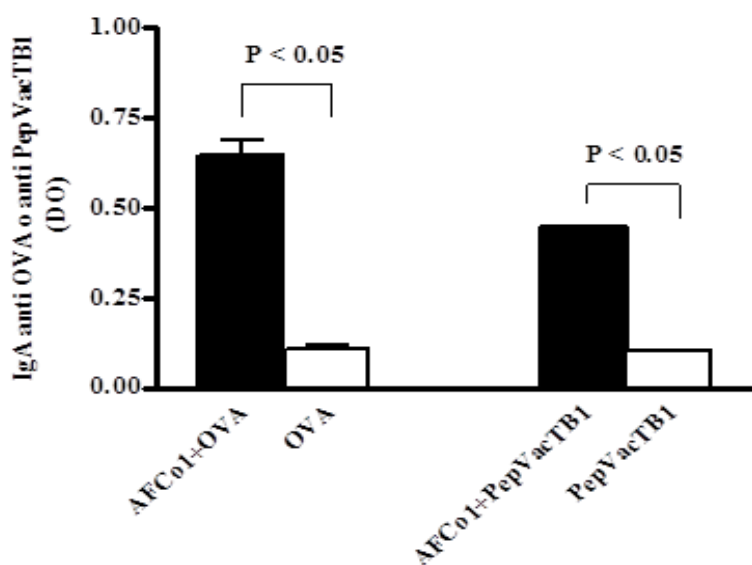


Figura 21. Respuesta de IgA anti PepVac TB1 y anti OVA en saliva, inducida por la inmunización por vía IN (AFCo1+OVA (60 μ g+10 μ g), AFCo1+PepVac TB1 (50 μ g+ 10 μ g). La media y las desviaciones estándares fueron realizadas a partir de las densidades ópticas (D.O.) obtenidas a 492 nm referentes a las muestras de saliva diluidas a 1:10. Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$), la prueba t de “student” se utilizó para el análisis de los datos

IV.6.3 Determinación de subclase de Ac IgG anti-OVA, anti PepVac TB1anti y antiTB1r.

Como puede apreciarse en la Figura 22, en todos los casos cuando se administró el antígeno con el AFCo1 las respuestas de anticuerpos específicas de las subclases IgG1 e IgG2a fueron superiores a las obtenidas con el antígeno solo y la diferencia fue estadísticamente significativa. También en todos los casos en que el Ag se formuló con el adyuvante la respuesta de IgG1 fue superior a la de IgG2a.

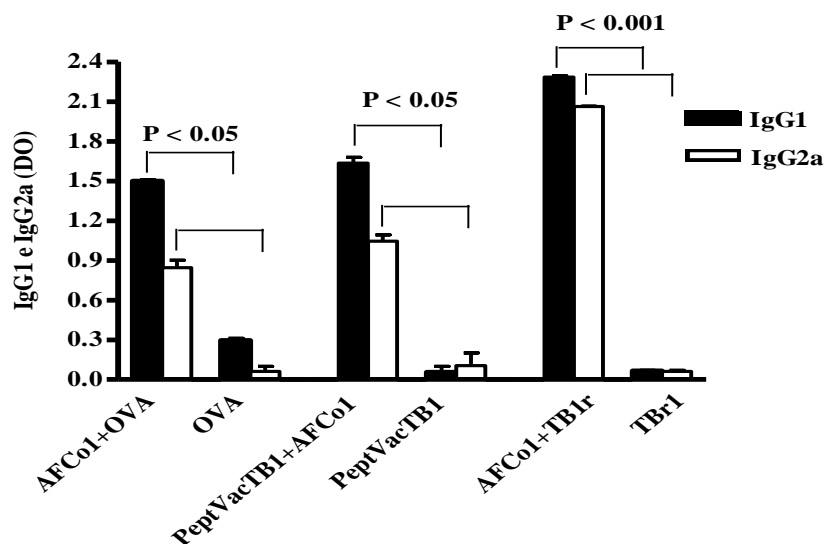


Figura 22. Niveles de IgG1 e IgG2a anti OVA, anti PeptVacTB1, anti TB1r en el suero de ratones inmunizados por vía IN. El gráfico muestra la inducción de IgG1 e IgG2a específica al co-administrarse el AFCo1 con los antígenos OVA, PeptVacTB1, TB1r. Los datos se expresan como la densidades ópticas (DO), media \pm desviación estándar. La prueba t de “student” se utilizó utilizada para el análisis de los datos

IV.6.4 Proliferación de linfocitos en ratones BALB/c inmunizados con AFCo1+PepVac TB1

La Figura 23, muestra el porcinto de células CD4+ y CD8+ en presencia de antígeno solo y en la formulación adyuvada con AFCo1, siendo muy superior en este último caso. El AFCo1 adyuvado al PepVac TB1 generó clones tanto de CD4+ (I.E. = 2,48) como CD8+ (I.E. = 2,23), capaces de proliferar contra el PepVacTB1.

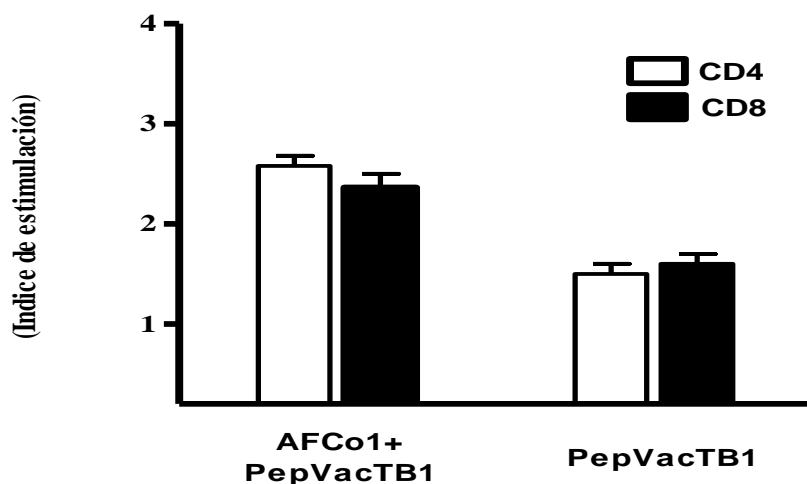


Figura 23. Valores del Índice de estimulación (I.E.) de esplenocitos CD4⁺ (barras blancas) y CD8⁺ (barras negras) de ratones BALB/c inmunizados por vía IN con PepVacTB1 adyuvado con AFCo1, sacrificados dos semanas después de la última inmunización.

IV.6.5 Producción de IFN γ , IL-4 e IL10 en ratones BALB/c inmunizados con AFCo1+PepVac TB1

El AFCo1 administrado con el péptido fue capaz de estimular la producción de IFN γ a concentraciones cercanas a los 800 pg/mL/10⁶ células y en menor medida la producción de IL-10 a concentraciones detectables, pero inferiores a los 100 pg/mL/10⁶ células. Las células estimuladas con el péptido solo produjo niveles de IFN γ inferiores a los 300 pg/mL/10⁶ células y no se detectaron niveles de IL-10. En ninguno de los caso se detectó la producción de IL4. (Figura 24).

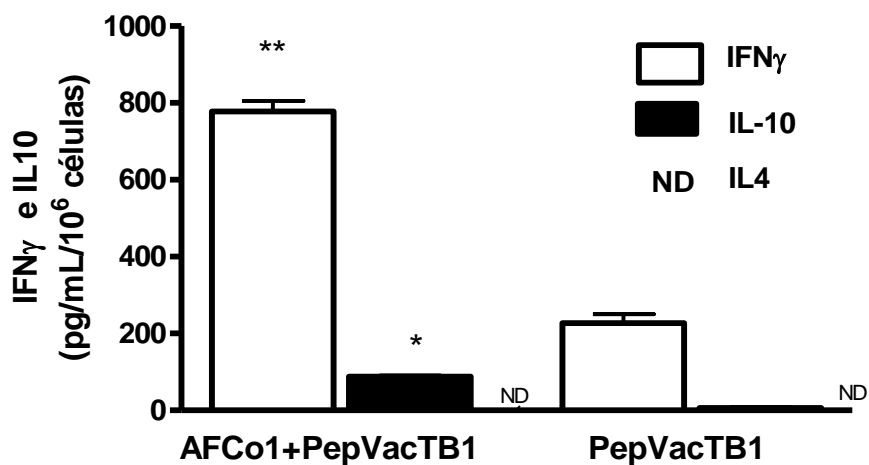


Figura 24. Producción de IFN γ e IL-10 y no producción de IL4 en ratones BALB/c inmunizados por vía IN con péptido PepVacTB1 en presencia o no de AFCo1. Los animales fueron sacrificados dos semanas después de recibir la última dosis. Se detectaron niveles IFN γ e IL10 después de estimular con péptido PepVac TB1, no se observaron niveles de IL4 (ND: no detectable). * Denota diferencias significativas con $p < 0.05$, prueba t de “student” entre los niveles inducidos por la formulación adyuvada y el antígeno solo.

V. DISCUSIÓN

Este capítulo aborda la discusión de los resultados, presentando primeramente aspectos generales, seguidos por los comentarios de los estudios previos y su relación con los resultados de la investigación que nos ocupa.

Los cocleatos como se ha señalado previamente, son estructuras compactas formadas por múltiples capas lipídicas enrolladas sobre sí misma en forma de espiral. La elevada estabilidad de los Co, está dada por la formación de puentes catiónicos (Ca^{2+}) entre las cabezas polares de los fosfolípidos de membranas adyacentes, con una sustancial reducción del espacio acuoso (91). La disminución de la concentración de estos iones divalentes conlleva al desenrollamiento del cocleado. Este proceso puede ocurrir de forma natural al ser administrado en animales o humanos resultando en la liberación lenta de los antígenos presentes tanto en la membrana lipídica como en el interior de la estructura. Por otro lado, los cocleatos poseen similitud estructural con estados intermediarios de los procesos naturales de fusión de membranas (93), siendo esta otra de las características que los hace potentes inmunógenos. Debido a la elevada estabilidad e inmunogenicidad se convierten en excelentes candidatos para el desarrollo de vacunas administradas por vía parenteral o mucosal (138). Un aspecto importante a destacar es la fuente de lípidos utilizada para la formación de la membrana de partida en la constitución del cocleato. Hasta el momento, los trabajos con estructuras cocleares han empleado membranas lipídicas obtenidas por mezcla de diferentes lípidos comerciales, algunos de los cuales son de procedencia animal y difícil de obtener. En nuestro caso, la fuente de lípidos es la membrana externa de la *N. meningitidis* serogrupo B de donde se extraen en forma de vesículas que también contienen proteínas y lipopolisacáridos (LPS)

(56, 139). El empleo de esta fuente brinda numerosas ventajas entre las cuales podemos mencionar: utilización de lípidos del patógeno, relativo bajo costo de producción mediante el empleo de tecnologías establecidas en la planta de producción de vacunas, posibilidad de producir grandes cantidades de materia prima con Buenas Prácticas de Producción (BPP) y contar con una propiedad industrial . Por otro lado, la presencia de proteínas y LPS, incrementan la inmunogenicidad de los cocleatos obtenidos y hace que estos constituyan en sí un candidato vacunal contra *N. meningitidis* serogrupo B que pudiera administrarse por vía mucosal. La vacunación por esta vía resulta de singular importancia para la protección de las superficies de mucosa contra este patógeno.

En trabajos previos del Dpto. de Inmunología del Instituto Finlay, los cocleatos se obtuvieron a partir de PL resuspendido en tampón Tris-EDTA- DOC. Luego de obtenida la suspensión, se incrementó la concentración de DOC hasta el 5% para lograr transparencia de la solución como medida de la completa solubilización del PL. Posteriormente, la formación de las estructuras cocleares fue propiciada mediante la eliminación del detergente y el incremento de la concentración de iones Ca^{2+} en la suspensión. Este proceso se realizaba por diálisis en bolsas de membrana de nylon con 10 kDa de tamaño de poro, contra dos soluciones tamponadas. Con el primer tampón o solución A (NaCL 100 mM/L (Fluka), Imidazol 2 mM/L (Merck) y HEPES 2 mM/L (Sigma)), se realizaban 5 cambios, y un segundo paso con igual número de cambios contra solución A más CaCl_2 5 mM (Fluka) (55).

Obtención del AFCo1 por FT. Caracterización físico/químico e inmunológica de la estructura obtenida.

La metodología de diálisis, no permitía el proceso de escalado y la manipulación dificultaba la obtención del producto en condiciones asépticas a escala de producción. Por lo que se evaluó posteriormente un proceso de FT con membrana plana. Los procesos de FT con membrana plana no resultaron eficientes ya que las membranas se obstruían con facilidad, obteniéndose muy bajos rendimientos, coincidiendo con lo planteado en la literatura (59, 111).

Por las razones antes expuestas, se decidió evaluar una configuración de cartuchos de fibra hueca. La porosidad y el materia del cartucho a emplear fue 10 kDa, polisulfona, y con un área de filtración de 0,45 m². Adicionalmente, se trabajó con volúmenes entre 2,0 y 3,0 L. La nueva configuración de cartucho de fibra hueca permitió un mejor control del proceso y sus parámetros. Se fijaron nuevas condiciones de operación, tales como flujo de recirculación y presión de trabajo. Con este tipo de configuración era mucho mejor diafiltrar la suspensión que se forma en el proceso. Además, para mejorar el trabajo del cartucho y evitar la acumulación de partículas, se invirtió la entrada del mismo y se alimentó por la parte superior. En el primer proceso en este tipo de configuración (P-08-Co/B) no se obtuvieron cocleatos, detectándose la formación de agregados proteicos, mediante la observación al microscopio. La ausencia de cocleatos, se evidenció además, por la baja concentración de proteínas tanto en la suspensión como en el precipitado en el cuarto lavado. En los siguientes procesos, el aumento de los tiempos de lavado, utilizando bajas presiones, se asoció con la formación de los cocleatos observados al microscopio en muestras de la etapa de formación.

En esta configuración se hizo necesario continuar la modificación de los tampones de resuspensión, de formación y de lavado, por inestabilidad en los resultados (Tabla 2). El hecho de utilizar un sistema de mayores dimensiones permitió incrementar el flujo de recirculación, debiéndose mantener la presión de entrada entre 0,1 y 0,3 bar. Con tales modificaciones se logró la obtención de un proceso (P-13-Co/B) con resultados estables que permitió emplearlo como proceso estándar.

El comportamiento hidrodinámico de los procesos de filtración por fibra hueca, fue diferente a los reportados en la literatura para este tipo de proceso (109) (véase también Figura 3, anexos), mostrando un flujo de filtrado inicial alto con una ligera tendencia al aumento durante la primera etapa. El rango dinámico lento (que coincide con la formación de la torta) característico de los procesos de filtración tangencial no se observó. Este comportamiento puede deberse a que se trabajó con un alto flujo de recirculación y muy baja presión en el retorno (0,1 bar), además del efecto de la suspensión sobre la superficie de la membrana, logrando un arrastre efectivo sobre la misma. En la segunda etapa, el flujo de filtrado comenzó alto, este estuvo favorecido por el aumento ligero de la presión en el retorno a 0,2 bar. La tendencia en este caso fue de un aumento en el flujo de filtrado al incrementarse el número de lavados. Esto pudiera ser un indicador de la eliminación de los pequeños cristales de calcio, quedando el producto enriquecido con los cocleatos que son de mayor talla y más homogéneos en cuanto a forma. Tampoco pudo ser observado en esta segunda etapa el rango dinámico lento, ni el consiguiente estado estacionario del flujo de filtrado.

El cambio de las características organolépticas de la suspensión de PL, caracterizado por el paso de una solución completamente transparente a una suspensión formada por un

precipitado blanquecino, sugiere la transformación de la estructura del PL en AFCo1. Este cambio, ha sido informado por varios autores como indicativo de la formación de cocleatos (92, 140,102).

Durante todo el proceso de obtención del cocleato se determinó la concentración de proteínas y fosfolípidos que resultaron útiles para el seguimiento del rendimiento del proceso así como para la caracterización bioquímica del producto final. De forma general los rendimientos mostraron ser elevados para este tipo de operación, con un recobrado superior al 80%.

Las estructuras microtubulares que se observaron (Figura 5 A) tienen las características morfológicas semejantes a los cocleatos derivados de las membranas de bacterias descritas por Pérez O y cols. (59). El tamaño de los microtubos o AFCo1, obtenidos por FT, se determinó a través de una escala graduada en el lente de un microscopio óptico. Estas estructuras tiene un tamaño de $11,6 \pm 3,7\mu\text{m}$ y la apariencia de la formulación es la de una suspensión blanquecina que sedimenta (Figura 14 A y B) luego de permanecer un tiempo en reposo (1-2h). El AFCo1 se evaluó por MEB y se observó que está formado por múltiples láminas dispuestas unas sobre otras, tal y cómo había sido reportado por Pérez O y cols (59). Varios autores (92, 93, 99) han descrito a los cocleatos como estructuras formadas por una única lámina (bicapa) de Flps que se enrolla sobre sí misma y adoptan una formación multilaminar con un patrón en espiral que se asemeja a un caracol.

Partiendo del conocimiento de la capacidad del PL de inducir una potente respuesta inmune de tipo Th1 (50), la inducción de este tipo de respuesta por el AFCo1, requiere de la presencia de los determinantes inmunogénicos del PL en estas estructuras. A través

de SDS-PAGE, se demostró que el proceso de transformación estructural mediante la tecnología de filtración tangencial permite la incorporación en el AFCo1 de las proteínas mayoritarias presentes en el PL, rindiendo una correlación del 96% entre los perfiles proteicos (Figura 6). El análisis densitométrico de los perfiles proteicos demostró que no se afectó la estructura de las proteínas, o al menos no las propiedades electroforéticas y peso molecular de estas durante el proceso de FT. Adicionalmente, se realizó inmunotransferencia para demostrar que en el AFCo1 se conserva la capacidad de los determinantes antigénicos de ser reconocidos por sueros específicos. Estos resultados pueden sustentar la idea, de que durante el proceso de transformación, el AFCo1 retiene la capacidad de estimular al sistema inmune de manera similar al PL que les dió origen. Una vez determinado que el proceso de FT no afectó la transformación del PL en AFCo1, conservando las propiedades inmunoquímicas, fue importante determinar si este era inmunogénico. Para ello se determinó la respuesta inmune contra antígenos del propio PL, comprobándose que las estructuras obtenidas pueden funcionar por vía mucosal. El funcionamiento del AFCo1 por vía mucosal puede representar un paso de avance importante para el desarrollo de una vacuna nasal contra *N. meningitidis* serogrupo B.

La aplicación del AFCo1 por vía IN indujo elevadas respuesta de Ac IgA anti PL (saliva), Ac de isotipo IgG clase y subclases (IgG1 e IgG2a) en suero, así como una elevada producción de IFN γ .

El AFCo1 administrado por vía nasal, fue capaz de estimular la producción de IgA específica en saliva, lo cual sugiere la capacidad de estas estructuras de acceder a los sitios inductores del Tejido Linfoide Asociado a la Nasofaringe (TLAN) y activar

eficientemente los mecanismos de inducción de la respuesta inmune a nivel mucosal para la generación de células productoras de IgA. Se generó una elevada respuesta de IgA, a los 7 días después de una tercera dosis.

La producción de anticuerpos IgG en suero inducida por la administración mucosal implica la migración de CDm hacia los nodos linfáticos regionales para presentar los antígenos capturados en las mucosas y la consecuente activación de la respuesta sistémica, o la migración de LΦT activados en el TLAN, para la cooperación con LΦB en periferia y la diferenciación de éstos en células plasmáticas productoras de IgG circulantes en sangre. En la inmunización parenteral, las CD migran directamente a los nódulos linfáticos regionales (141, 142).

Paralelamente, se evaluó la composición de subclases de los anticuerpos IgG anti PL en el suero. Los resultados mostraron que el AFCo1 propicia la inducción de niveles de IgG2a más elevados que los de IgG1 contra el PL, al ser administradas por vía nasal. Esta observación, constituye otra evidencia de que la transformación estructural del PL en AFCo1, permite potenciar la respuesta inmune de tipo Th1. La administración IN del AFCo1, generó una composición del patrón de subclases más polarizada hacia Th1, con niveles de IgG2a algo más altos que los de IgG1. Estos resultados están de acuerdo con varios informes, que sugieren que el TLAN es un sitio donde la inducción de respuesta Th1 se favorece (49, 143).

Para confirmar la inducción de una respuesta Th1 por los AFCo1, se desarrollaron experimentos *in vivo* para evaluar la producción de IFN γ por LΦT y la inducción de HR. La capacidad de estimular la producción de IFN γ fue evaluada en células de bazo de ratones inmunizados con AFCo1 re-estimuladas *in vitro* con PL. Los cocleatos fueron

capaces de estimular eficientemente la producción de IFN γ . Teniendo en cuenta que esta citocina es producida principalmente por los L Φ T, este resultado constituye una evidencia de la presencia de clones de tipo Th1 en las células de bazo aisladas (144). En la Figura 15 se puede observar, que el AFCo1 indujo niveles elevados de IFN γ , sugiriendo una gran eficiencia para activar y diferenciar los L Φ T hacia Th1, no fue detectada producción de IL5. La funcionalidad de la respuesta Th1 inducida, puede ser comprobada *in vivo* mediante pruebas de HR (145). Las reacciones inflamatorias mediadas por células, luego de un desafío antigénico subcutáneo en animales inmunizados, son la base de las pruebas de HR. La causa de la inflamación es debido a la migración de diferentes células del torrente sanguíneo hacia el sitio de inmunización, formando una induración que puede ser cuantificada. Los linfocitos Th1 circulantes una vez activados por el reconocimiento del antígeno juegan un papel principal en la producción local de IFN γ y la activación de otros tipos celulares como los macrófagos, para la producción coordinada de citoquinas pro-inflamatorias y quimoquinas (146, 147). En animales inmunizados con AFCo1, se evidenció la capacidad de éste de inducir reacciones positivas de HR. En estudios previos, se demostró que el PL por sí solo o como parte de VA-MENGOC-BC® es capaz de inducir reacciones positivas de HR (50). Por ello, estos resultados demuestran que esta propiedad del PL se conserva en los AFCo1.

Estos resultados en su conjunto confirman que el AFCo1 puede ser obtenido por filtración tangencial sin afectar su estructura, ni su actividad biológica. El uso de estas estructuras por vía mucosal estimula el sistema inmune induciendo una potente respuesta local y sistémica, característica de un patrón Th1.

Estudio de estabilidad preliminar y de toxicidad del AFCo1 obtenido por FT

La estabilidad de un producto es definida como la habilidad para mantener la validez de un producto en términos de seguridad y eficacia durante la fabricación y en condiciones de almacenamiento.

La vida media, así como las condiciones de almacenamiento son definidas solamente por estudios de estabilidad de vida estante. También es de vital importancia estudiar el comportamiento del producto ante el impacto de cortos períodos fuera de las condiciones de almacenamiento indicadas (condiciones de estrés) o lo que es lo mismo ante fallos en la cadena de frío (148).

La microscopía óptica (Figura 5 A) es fundamental para identificar la formación del AFCo1 a partir del proteoliposoma de *N. meningitidis* serogrupo B, pero también permite hacer mediciones para determinar su tamaño (longitud). La Difractometría láser también se empleó para la medición de las partículas cocleares (Figura 13) las cuales coincidían con las obtenidas por microscopio óptico. Fueron observados en este estudio, la presencia de estructuras tubulares alargadas con extremos irregulares y un tamaño promedio por debajo de las 30 μm , coincidiendo con lo descrito por Pérez O y cols, 2006 (59). Tanto en la estabilidad en vida estante como acelerada, ambos parámetros (forma y tamaño) se comportaron de manera satisfactoria.

El pH es un parámetro que puede variar durante el tiempo de vida útil de los productos ya sea por inestabilidad inherente a la formulación o debido a la posible migración de iones desde el material de envase hacia el producto, de ahí la selección de este parámetro como uno de los evaluados en todos los tiempos de muestreo durante el estudio de

estabilidad. En la Tabla 16 se puede observar que todos los resultados obtenidos para este parámetro fueron satisfactorios en todas las temperaturas evaluadas.

La observación de un cambio drástico de las características organolépticas del PL durante la etapa de formación al diafiltrar contra un tampón que contenía Ca^{2+} , dió como resultado la formación de una suspensión blanquecina (apariencia descrita para estructuras cocleares (92, 102), la cual sedimentó al dejarla en reposo. El calcio en las estructuras cocleares le confiere a las mismas una elevada estabilidad (55). Las concentraciones de Ca^{2+} utilizadas por Gould-Fogerite y col y Pahadjopoulos y col, varían entre 1 y 6 mM, siendo la concentración de 5 mM la más comúnmente empleada para inducir la formación de cocleatos (92, 138). Durante la etapa de formación del AFCo1 (4 volúmenes de diafiltrado) se va adicionando Ca^{2+} a una concentración de 5 mM. El exceso de Ca^{2+} , así como otras sustancias consideradas tóxicas para el organismo, son eliminados durante la etapa de lavado. Debe tenerse en cuenta que el calcio libre debe quedar a una concentración entre 2 y 5 mM, lo cual no permite la desestabilización del cocleato. La concentración de Ca^{2+} libre en los ensayos de estabilidad propuestos cumplió con el límite de aceptación establecido.

Teniendo en cuenta que el PL constituye el ingrediente farmacéutico activo del AFCo1, se considera importante evaluar la concentración de proteína, lo cual garantiza la calidad biológica del producto final. La desnaturalización en muchas proteínas, es un proceso que afecta irreversiblemente a la misma, de manera tal que esta llega a perder su función biológica. Uno de los factores que influye en esto es la temperatura. Sin embargo, la concentración de proteínas no se vio afectada en ninguna de las tres temperaturas evaluadas. La identidad de las proteínas también fue evaluada conservándose el perfil

proteico del PL en el AFCo1 obtenido (59), mostrándose este perfil, en todas las temperaturas y tiempos del ensayo.

El parámetro de esterilidad de productos farmacéuticos para la administración en humanos está descrito en las Farmacopeas de los Estados Unidos y la de Europa donde son establecidos rigurosos límites de aceptación. Según las características del producto será el método a seleccionar. Se evidenció la efectividad antimicrobiana del tiomersal utilizado como preservativo para la formulación final del AFCo1 cumpliendo el criterio de aceptación aplicado en vacunas de uso humano (132, 133).

También la efectividad antimicrobiana, ya sea inherente al producto o debida a la adición de un preservativo, debe ser demostrada para todas las formas farmacéuticas, incluyendo los inyectables, en estos la actividad antimicrobiana del preservativo permite la protección del producto ante el crecimiento microbiano que pueda introducirse inadvertidamente durante o subsecuente al proceso de manufactura y en el caso de envases de dosis múltiples, inhiben el crecimiento de microorganismos que pueda adquirirse por el manejo repetido del producto, al extraerse dosis individuales. Los resultados obtenidos fueron todos satisfactorios (133).

Por último se evaluó tanto en el ensayo de estabilidad en vida de estante como el acelerado la cuantificación de anticuerpos IgG. La respuesta de Ac IgG fue consistente a las diferentes temperaturas del estudio, demostrando valores elevados.

Un modelo animal relevante para la evaluación toxicológica de una vacuna o un adyuvante debe responder inmunológicamente a los antígenos constituyentes de la vacuna en cuestión. De esta manera, es posible probar, no solamente la toxicidad intrínseca de los componentes vacunales, sus contaminantes y la resultante de la

interacción entre ellos, sino también la toxicidad potencial asociada a la respuesta inmune inducida por la vacuna o el adyuvante (149, 150).

La administración mucosal por la vía intranasal de un producto con efectos adyuvantes vacunales ha sido muy poco explorada desde el punto de vista toxicológico preclínico. El hecho de que solo dos capas de células separen el lumen de la cavidad nasal de una rica red vascular en la lámina propia, hace a la mucosa nasal vulnerable a los efectos adversos de una formulación administrada por esta vía.

La rata Sprague Dawley, es una línea heterogénea preferida para los estudios de seguridad preclínicos debido a la diversidad de su respuesta (151). Además, esa línea se considera modelo relevante para la evaluación de la toxicidad del AFCo1.

El estudio de tolerancia local en ratas Sprague Dawley, tuvo como objetivo evaluar la toxicidad potencial del candidato vacunal localmente a nivel de fosa nasal. No se detectaron síntomas clínicos que comprometieran el sistema respiratorio, las ratas mantuvieron una conducta a la esperada para esta especie, línea y edad. El incremento del consumo de agua y alimentos (sobre todo en las ratas machos) fue el esperado entre sexos, dadas las diferencias fisiológicas conocidas entre estos. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en las Instalaciones del Instituto Finlay, Sosa y cols. y Infante JF y cols. (152 y 153) cuando realizaron estudios de toxicidad a productos vacunales como *vax-Tyvi®* y VA-DIFTET respectivamente, donde los grupos las ratas machos consumieron más aguas y alimentos que las hembras.

Al igual que en el consumo de agua y alimentos, el incremento del peso de los animales fue el esperado según sexo, coincidiendo con una mayor ganancia en peso en las ratas macho, lo cual constituye un índice de bienestar de los animales. Estos resultados estan

acorde con los obtenidos en otros estudios de toxicidad de productos afines conducidos en ratas de la línea Sprague Dawley, en condiciones de tenencia y manejo similares Infante JF y cols. y López Y y cols. (154, 155)

El estudio histopatológico no mostró alteraciones significativas cuando se administró este producto por vía intranasal. Los signos reportados fueron principalmente reacciones inflamatorias de diferentes intensidades (discretas, moderadas), según la extensión de la reacción y el número de células presentes.

Los discretos focos de inflamación (pocas células) con escasa significación patológica encontrados en los animales del grupo control (sin inocular) y el grupo placebo pudieran asociarse a que a través de la mucosa nasal se incorporan al organismo múltiples antígenos que a través de las barreras naturales penetran y desencadenan ese tipo de reacciones inflamatorias. Además, estos animales no clasifican ni como libres de patógenos, ni como libres de patógenos específicos pues para ello se necesita de aisladores en los cuales los animales no están en contacto con ningún microorganismo (40, 127).

Como se puede observar en la Tabla 17, las lesiones encontradas tuvieron relación directa con el aumento de las concentraciones del producto (AFCo1). El proceso inflamatorio moderado con la presencia de células polimorfonucleares neutrófilos en la lámina propia de la mucosa a nivel de cornetes nasales del corte de la zona posterior (figura 19), se evidenció en animales inoculados con una concentración de 200 µg de cocleatos (máxima concentración de aplicación del producto). También se observaron algunos agregados de células linfoides a nivel de dicha lámina, que pudieran estar relacionados con la respuesta inmune a este nivel. La presencia de agregados de células

linfoides focales o difusos pudiera obedecer a que en la lámina propia de la mucosa existen poblaciones mixtas de linfocitos (fundamentalmente Linfocitos T CD4+ y células B) que exhiben un fenotipo de células activadas como consecuencia de su estimulación en la inmunidad mucosal, por lo que su presencia forma parte de la anatomía funcional de este tejido ante una estimulación antigénica (156, 157, 158).

La principal preocupación en el uso de la vía intranasal es la posibilidad de acceso directo al SNC a través del nervio olfatorio (159). Los estudios microscópicos del sistema nervioso central no mostraron alteraciones que evidenciaran compromiso de este, debido a la utilización del producto. No obstante se debe profundizar en los estudios de neurotoxicidad, tales como los conductuales y de reflejos, así como estudios *in vitro* (160) que permitan reunir evidencias que indiquen que la inmunización intranasal con AFCo1 es potencialmente no tóxica.

Como se planteó con anterioridad los estudios de toxicidad en ratas Sprague Dawley se realizaron con el objetivo determinar la toxicidad potencial, letalidad, órganos, sistemas susceptibles y otros eventos adversos, así como la toxicidad en el sitio de inoculación después de la administración de una dosis del producto en estudio.

Para incrementar la exposición de las ratas al AFCo1 y probar el riesgo potencial de una sobredosis accidental, fue realizado un estudio de toxicidad con cuatro dosis. Este diseño está en correspondencia con tendencias actuales en la evaluación preclínica de vacunas preventivas que sugieren la adición de una dosis adicional a la que se propone para la clínica (161).

La curva de crecimiento, las tomas de agua y comida, valores químicos de sangre y los pesos relativos de órgano en las ratas, en las pruebas conducidas (dosis única y repetida),

coinciden con lo observado en las ratas Sprague Dawley durante la valoración preclínica de otras candidatas vacunales en las instalaciones del Instituto Finlay (152, 154, 155, 162) y referencias de valores publicados por el Servicio de Información Veterinaria Internacional (163).

Los cambios histológicos fueron parte de reacciones fisiológicas o incidentales, pero no podría establecerse un enlace causal con la toxicidad. La congestión vascular mucosal refleja una hiperemia fisiológica normal del epitelio nasal (156). Los agregados focales o células linfáticas encontradas en la lámina propia son parte de la anatomía funcional del tejido de la mucosa y son representados principalmente por los linfocitos B y las células T CD4+. Los linfocitos apoptóticos y los folículos secundarios en el área cortical y paracortical de los nódulos linfáticos también han sido observados por otros autores y son asociados a la respuesta de tejidos linfoides secundarios activados por los estímulos antigénicos (164, 165).

La hemorragia tipo petequiral observada en los ganglios linfáticos de la región de la cabeza, del cuello y de las axilas, pudiera estar relacionado con la manipulación (restricción del animal) realizada durante el proceso de sedación, inoculación y desangrado. Por lo cual no se considera que estas alteraciones guarden relación con procesos de tipo toxicológicos. Además los cambios se observaron en todos los grupos en experimentación.

La neumonía intersticial se observó en todos los grupos del ensayo. Esta neumonía es frecuentemente observada como consecuencia de procesos infecciosos virales que afectan el tracto respiratorio, en ratas sanas criadas en ambientes convencionales (158, 155, 166).

Sin embargo, resulta interesante que las ratas tratadas con AFCo1 desarrollaron una neumonía en proporciones bajas ($P < 0,05$) comparada con las ratas del grupo placebo y control. Esto probablemente pudiera estar relacionado con el efecto inmunomodulador del AFCo1 (56, 61).

En la región nasal se valoró en cada animal la presencia e intensidad de enema, congestión nasal, estado del epitelio y el infiltrado leucocitario. A partir de estas valoraciones se calculó el índice de irritabilidad según se describe para estudios de irritabilidad mucosal de fármacos (135). Este índice de irritabilidad resultó en las pruebas realizadas inferior a 1, lo cual clasificó al producto en cuestión como no irritante.

Estos resultados sugieren la idea de que el AFCo1 pudiera ser capaz de inducir y modular la respuesta inmune después de una instilación nasal sin afecciones significativas de la histología en el sitio de inoculación como ha sido previamente mostrado por estudios farmacológicos y de toxicidad local (56, 60, 139). El AFCo1 pudiera considerarse potencialmente no tóxico para humanos por administración IN a dosis única, repetida y tolerancia local.

Formulación de AFCo1 con antígenos no relacionados con el PL y evaluación de su efecto adyuvante.

Una potencialidad del AFCo1 aún poco explorada, es la adyuvación con antígenos no relacionados con el PL. Esto, unido a los PAMPs que contiene, pudiera convertirlos en un adyuvante vacunal atractivo. En este sentido, se exploró la capacidad del AFCo1 al formularlo con antígenos como OVA, 1 o TB1r, aplicados por vía nasal.

Estos resultados mostraron que la inmunización IN de AFCo1+OVA; AFCo1+PepVacTB1 o AFCo1+TB1r indujeron altos niveles de IgG específica contra los antígenos adyuvados en suero, mientras que los antígenos sin adyugar no indujeron respuestas relevantes. Estos resultados, sugieren la capacidad del AFCo1 de potenciar la respuesta inmune contra un antígenos no relacionados con el PL, en especial antígenos poco inmunogénico como Ova y el PepVacTB1, lo cual tiene una gran importancia sobre todo si consideramos que la Ova, incluso aplicada en dosis de hasta 1 mg, no induce niveles detectables de anticuerpos en suero (167). Este resultado implica la activación de células Th específicas, capaces de cooperar con las células B e inducir el cambio de clase de inmunoglobulina para la producción de anticuerpos IgG. Paralelamente, se evaluó la composición de subclases de los Ac IgG anti-OVA, anti-Pep-Vac TB1 y anti-TBr séricos. Los resultados mostraron que en las formulaciones adyuvadas se indujo elevados niveles de subclases de IgG1 e IgG2a contra los antígenos en estudio. Sin embargo los niveles de IgG2a fueron menores. Este comportamiento fue similar al encontrado por del Campo y cols (49, 90) y Bracho y cols (106), que evaluaron el efecto adyuvante de el AFCo1, obtenido por el método de diálisis, sobre antígenos de Ova, la glicoproteína D recombinante (gD) del Virus Herpes Simple tipo 2 y *Plasmodium falciparum*, respectivamente. Se considera importante la inducción de subclase IgG2a ya que esta es la que media la óptima fijación del complemento y se une con gran afinidad a los receptores de los MΦ. Estudios con infecciones virales como Ébola e Influenza demuestran que la IgG2a es más efectiva para eliminar las infecciones que el isotipo IgG1, ya que es capaz de estimular mecanismos efectores en el hospedero (168, 169). La inducción de la subclase IgG2a también está muy relacionada con la

inducción de un patrón de respuesta Th1 (170), aunque la polarización de la respuesta inmune se verifica a partir del perfil de citoquinas que se induce (171).

Al administrar AFCo1+OVA, AFCo1+PepVacTB1 se detectaron niveles de IgA específica en saliva, aunque en la última formulación los resultados fueron muy discretos. Los resultados mostraron que la administración nasal estimuló la producción de IgA anti-OVA, Pep TB específica en saliva. Estos resultados sugieren que la formulación adyuvada del AFCo1 con los antígenos en estudio puede eficientemente entregar los antígenos a las CPA y proveer el contexto adecuado para activar la respuesta inmune. La respuesta de IgA juega un papel importante en la defensa mucosal contra agentes patógenos a través de un número de diferentes mecanismos. Los anticuerpos IgA pueden bloquear bacterias y virus, neutralizar toxinas bacterianas e inclusive desactivar a los patógenos que se encuentran internalizados dentro de las células epiteliales (172, 173).

La capacidad proliferativa frente al péptido PepVac TB1 de esplenocitos de ratones inmunizados con AFCo1+ PepVac TB1 por la vía IN fue evaluada. Esta formulación resultó capaz de generar clones tanto de CD4⁺ como de CD8⁺, proliferando contra el péptido. También se demostró que en los grupos donde se inmunizó el PepVac TB1 adyuvado con AFCo1el se indujeron niveles elevados de IFN γ . La producción de citoquinas asociada a la proliferación de células T es una de las formas más importantes de evaluar la respuesta inmune. Especialmente, la producción de IFN γ es considerada una evidencia capital de la activación de células T CD4⁺ de tipo Th1 (174). La inducción de respuesta de IFN γ así como la presencia de T CD4⁺ en células de bazo hizo más evidente que la inmunización de los ratones por vía IN con la formulación de AFCo1

con antígenos no relacionados con el PL indujo una fuerte respuesta antígeno-específico de inmunidad mediada por células de tipo Th1. Por otro lado, no se detectó IL-4, lo cual que está relacionado con la polarización de la respuesta inmune hacia Th1, pues esta citocina se produce como parte del patrón de respuesta Th2 y constituye un regulador negativo del patrón Th1 (174).

También, se demostró la presencia de Interleucina 10, sólo en los grupos de PepVac TB1 adyuvado con AFCo1. Esta citocina está relacionada con un patrón de células T reguladoras, que pudieran estar induciéndose para regular negativamente el propio patrón Th1. Se ha demostrado que los linfocitos comprometidos con el propio patrón Th1 pudieran inducir IL-10 como un mecanismo de regulación negativa autólogo (175).

Por otro lado varios trabajos reportan que esta interleucina estimula la producción de IgA, a través de la diferenciación terminal de las células plasmáticas (176). Estas células producen IgA en forma dimérica o polimérica que se transforma en IgA secretora cuando se vincula con el componente secretor que se sintetiza en las células epiteliales (176). Sería interesante profundizar en los mecanismos de acción del AFCo1, particularmente en la inducción de citoquinas, que como la IL-10 y la IL-17 participan en mecanismos efectores contra patógenos bacterianos y la inmunidad mucosal. Por tal razón no es de extrañar que el AFCo1 formulado con el péptido sintético haya inducido niveles detectables de IL-10.

El tracto respiratorio es la ruta principal de infecciones con *Streptococo B* hemolítico, primordialmente en niños, por lo que sería ideal obtener un adyuvante capaz de inducir protección mucosal. Este conjunto de resultados demuestra la capacidad del AFCo1

obtenido por FT de inducir una respuesta Th1 contra antígenos no relacionado con el PL y aplicados por vía intranasal en ratones.

V.1 Consideraciones generales

En el presente trabajo, se describe la obtención del AFCo1 mediante la tecnología de Filtración Tangencial, a través de transformaciones estructurales del PL. Estas transformaciones estuvieron mediadas por iones divalentes, con grandes potencialidades para su uso como adyuvante. Se obtuvo una estructura coclear a partir del Proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* serogrupo B que contenía LPS, Porinas y trazas de ADN bacteriano que actúan, sinérgicamente, como PAMP, a través de los TLR4, TLR2 y TLR9, respectivamente. Se obtuvieron lotes a escala piloto que fueron posteriormente utilizados en ensayos de estabilidad. La pequeña talla del AFCo1 obtenido, se pudiera considerar ideal para su efectividad nasal. El AFCo1 pasó satisfactoriamente los ensayos de toxicidad preclínica. La administración intranasal del AFCo1 mostró un efecto adyuvante sobre antígenos poco inmunogénicos, inmunogénicos, así como contra los propios del PL. La respuesta inmune fue evaluada mediante la determinación de anticuerpos específicos (IgA en saliva e IgG sistémica), citocinas, y linfocitos T citotóxicos *in vivo*, lo que demostró finalmente la polarización de la respuesta inmune hacia un patrón preferencial Th1. En resumen, el AFCo1 es un novedoso adyuvante mucosal, escalado, estable y no tóxico que funciona por vía nasal frente a antígenos poco inmunogénicos o inmunogénicos.

VI. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el cocleato a partir de proteoliposomas de *N. meningitidis* B mediante la tecnología de Filtración tangencial con fibra hueca, a escala piloto, con las características físicas, químicas y biológicas del producto.
2. Los estudios preliminares de estabilidad de lotes de AFCo1 obtenidos a escala piloto mostraron la validez del producto en condiciones de almacenamiento seleccionadas.
3. El AFCo1 obtenido por filtración tangencial demostró ser potencialmente no tóxico al ser administrado por vía nasal según las condiciones de estudios establecidas
4. La formulación de cocleatos derivados del proteoliposoma de *N. meningitidis* B con antígenos proteicos y peptídicos, tuvo un efecto inmunopotenciador e inmunomodulador en la respuesta inmune inducida contra estos antígenos, lo que sustenta la capacidad adyuvante del cocleato (AFCo1).

VII. RECOMENDACIONES

1. Realizar 3 lotes consecutivos a escala piloto que permitan realizar los estudios de estabilidad y toxicidad del AFCo1.
2. Evaluar la capacidad adyuvante del AFCo1 contra otros antígenos y explorar otras vías de aplicación a nivel de mucosas.
3. Realizar un estudio clínico con un candidato vacunal que contenga en su formulación el AFCo1 como adyuvante.
4. Profundizar en los mecanismos de acción del adyuvante AFCo1.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kaufmann SH. Future vaccination strategies against tuberculosis: thinking outside the box. *Immunity*. 2010; 33(4):567-77.
2. Palucka K, Banchereau J, Mellman I. Designing vaccines based on biology of human dendritic cell subsets. *Immunity*. 2010; 33(4):464-78.
3. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 2010; 28 Suppl 3:C25-36.
4. Zhang X, Wang X, Zhao D, Meng X, Zhao X, Yu X, et al. Design and immunogenicity assessment of HIV-1 virus-like particles as a candidate vaccine. *Sci China Life Sci*. 2011; 54(11):1042-7.
5. Zhu D, McClellan H, Dai W, Gebregeorgis E, Kidwell MA, Aebig J, et al. Long term stability of a recombinant Plasmodium falciparum AMA1 malaria vaccine adjuvanted with Montanide((R)) ISA 720 and stabilized with glycine. *Vaccine*. 2011; 29(20):3640-5.
6. Vannice KS, Brown GV, Akanmori BD, Moorthy VS. MALVAC 2012 scientific forum: accelerating development of second-generation malaria vaccines. *Malaria journal*. 2012; 11:372.
7. O'Hagan DT. New Generation Vaccine Adjuvants. *Encyclopedia of life science*. New York: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.
8. Glenn GM, O'Hagan DT. Adjuvants: progress, regress, and pandemic preparedness. *Expert Rev Vaccines*. 2007; 6(5):651-2.
9. Nossal GJ. Vaccines and future global health needs. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2011; 366(1579):2833-40.
10. Phoolcharoen W, Dye JM, Kilbourne J, Piensook K, Pratt WD, Arntzen CJ, et al. A nonreplicating subunit vaccine protects mice against lethal Ebola virus challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011; 108(51):20695-700.
11. Gunther S, Feldmann H, Geisbert TW, Hensley LE, Rollin PE, Nichol ST, et al. Management of accidental exposure to Ebola virus in the biosafety level 4 laboratory, Hamburg, Germany. *The Journal of infectious diseases*. 2011;204 Suppl 3:S785-90.

12. Zheng Q, Fan D, Gao N, Chen H, Wang J, Ming Y, et al. Evaluation of a DNA vaccine candidate expressing prM-E-NS1 antigens of dengue virus serotype 1 with or without granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in immunogenicity and protection. *Vaccine*. 2010; 29(4):763-71.
13. Porter KR, Ewing D, Chen L, Wu SJ, Hayes CG, Ferrari M, et al. Immunogenicity and protective efficacy of a vaxfectin-adjuvanted tetravalent dengue DNA vaccine. *Vaccine*. 2011; 30(2):336-41
14. Maves RC, Ore RM, Porter KR, Kochel TJ. Immunogenicity and protective efficacy of a psoralen-inactivated dengue-1 virus vaccine candidate in *Aotus nancymae* monkeys. *Vaccine*. 2011; 29(15):2691-6.
15. Lu H, Xu XF, Gao N, Fan DY, Wang J, An J. Preliminary evaluation of DNA vaccine candidates encoding dengue-2 prM/E and NS1: Their immunity and protective efficacy in mice. *Mol Immunol*. 2012; 54(2):109-14.
16. Villa D, Gubbay J, Sutherland DR, Laister R, McGeer A, Cooper C, et al. Evaluation of 2009 pandemic H1N1 influenza vaccination in adults with lymphoid malignancies receiving chemotherapy or following autologous stem cell transplant. *Leuk Lymphoma*. Jan 8. PubMed PMID: 23240909. Epub 2012/12/18. Eng.
17. Nohynek H, Jokinen J, Partinen M, Vaarala O, Kirjavainen T, Sundman J, et al. AS03 adjuvanted AH1N1 vaccine associated with an abrupt increase in the incidence of childhood narcolepsy in Finland. *PloS one*. 2012;7(3):e33536.
18. Vujanic A, Wee JL, Snibson KJ, Edwards S, Pearse M, Quinn C, et al. Combined mucosal and systemic immunity following pulmonary delivery of ISCOMATRIX adjuvanted recombinant antigens. *Vaccine*. 2010; 28(14):2593-7.
19. Vermoote M, Van Steendam K, Flahou B, Smet A, Pasmans F, Glibert P, et al. Immunization with the immunodominant *Helicobacter suis* urease subunit B induces partial protection against *H. suis* infection in a mouse model. *Vet Res*. 2012;43(1):72.
20. Summerton NA, Welch RW, Bondoc L, Yang HH, Pleune B, Ramachandran N, et al. Toward the development of a stable, freeze-dried formulation of *Helicobacter pylori* killed whole cell vaccine adjuvanted with a novel mutant of *Escherichia coli* heat-labile toxin. *Vaccine*. 2010; 28(5):1404-11.

21. Raghavan S, Ostberg AK, Flach CF, Ekman A, Blomquist M, Czerkinsky C, et al. Sublingual immunization protects against *Helicobacter pylori* infection and induces T and B cell responses in the stomach. *Infect Immun*. 2010;78(10):4251-60.
22. Zhong Z, Wei X, Qi B, Xiao W, Yang L, Wei Y, et al. A novel liposomal vaccine improves humoral immunity and prevents tumor pulmonary metastasis in mice. *Int J Pharm*. 2010; 399(1-2):156-62.
23. Zhang Z, Tongchusak S, Mizukami Y, Kang YJ, Ioji T, Touma M, et al. Induction of anti-tumor cytotoxic T cell responses through PLGA-nanoparticle mediated antigen delivery. *Biomaterials*. 2011; 32(14):3666-78.
24. Zhang Y, Deng J, Feng J, Wu F. Enhancement of antitumor vaccine in ablated hepatocellular carcinoma by high-intensity focused ultrasound. *World J Gastroenterol*. 2010; 16(28):3584-91.
25. Klingenberg R, Lebens M, Hermansson A, Fredrikson GN, Strodthoff D, Rudling M, et al. Intranasal immunization with an apolipoprotein B-100 fusion protein induces antigen-specific regulatory T cells and reduces atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(5):946-52.
26. Klingenberg R, Ketelhuth DF, Strodthoff D, Gregori S, Hansson GK. Subcutaneous immunization with heat shock protein-65 reduces atherosclerosis in Apoe(-)/(-) mice. *Immunobiology*. 2011;217(5):540-7.
27. de Jager SC, Kuiper J. Vaccination strategies in atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;106(5):796-803.
28. Zepp F. Principles of vaccine design-Lessons from nature. *Vaccine*. 2010; 28 Suppl 3:C14-24.
29. Zhou C, Peng G, Jin X, Tang J, Chen Z. Vaccination with a fusion DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen fused to the extracellular domain of CTLA4 enhances HBV-specific immune responses in mice: implication of its potential use as a therapeutic vaccine. *Clin Immunol*. 2010; 137(2):190-8.
30. Winstone N, Wilson AJ, Morrow G, Boggiano C, Chiuchiolo MJ, Lopez M, et al. Enhanced control of pathogenic Simian immunodeficiency virus SIVmac239 replication in macaques immunized with an interleukin-12 plasmid and a DNA prime-viral vector boost vaccine regimen. *J Virol*. 2011; 85(18):9578-87.

31. Schell JB, Bahl K, Rose NF, Buonocore L, Hunter M, Marx PA, et al. Viral vectored granulocyte-macrophage colony stimulating factor inhibits vaccine protection in an SIV challenge model: protection correlates with neutralizing antibody. *Vaccine*. 2012;30(28):4233-9.
32. Miyata T, Harakuni T, Sugawa H, Sattabongkot J, Kato A, Tachibana M, et al. Adenovirus-vectored Plasmodium vivax ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. *Vaccine*. 2011; 29(15):2720-6.
33. Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert review of vaccines*. 2012;11(2):237-56.
34. O` Hagan DT, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Rev*. 2003; 2:727-35.
35. Bramwell VW, Perrie Y. Particulate delivery systems for vaccines: what can we expect? . *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(6):717-28.
36. Pérez O, Batista-Duharte A, Gonzalez E, Zayas C, Balboa J, Cuello M, et al. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]*. 2012; 45(8):681-92.
37. Spranger S, Javorovic M, Burdek M, Wilde S, Mosetter B, Tippmer S, et al. Generation of Th1-polarizing dendritic cells using the TLR7/8 agonist CL075. *J Immunol*. 2010; 185(1):738-47. PubMed PMID: 20511554. Epub 2010/06/01. eng.
38. Okada H, Kalinski P, Ueda R, Hoji A, Kohanbash G, Donegan TE, et al. Induction of CD8+ T-cell responses against novel glioma-associated antigen peptides and clinical activity by vaccinations with {alpha}-type 1 polarized dendritic cells and polyinosinic-polycytidylic acid stabilized by lysine and carboxymethylcellulose in patients with recurrent malignant glioma. *J Clin Oncol*. 2010; 29(3):330-6.
39. Lee WJ, Cha S, Shin M, Islam MA, Cho CS, Yoo HS. Induction of Th1 polarized immune responses by thiolated Eudragit-coated F4 and F18 fimbriae of enterotoxigenic Escherichia coli. *Eur J Pharm Biopharm*. 2011; 79(2):226-31.
40. Huang TW, Chan YH, Cheng PW, Young YH, Lou PJ, Young TH. Increased mucociliary differentiation of human respiratory epithelial cells on hyaluronan-derivative membranes. *Acta Biomater*. 2009; 6(3):1191-9.

41. Harding VC, Ramachandra L, Jo Wick M. Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Curr Opin Immunol.* 2003; 15:112-9.
42. Miyaji EN, Carvalho E, Oliveira ML, Raw I, Ho PL. Trends in adjuvant development for vaccines: DAMPs and PAMPs as potential new adjuvants. *Braz J Med Biol Res.* 2011; 44(6):500-13.
43. Demento SL, Siefert AL, Bandyopadhyay A, Sharp FA, Fahmy TM. Pathogen-associated molecular patterns on biomaterials: a paradigm for engineering new vaccines. *Trends Biotechnol.* 2011; 29(6):294-306.
44. Sierra GV, Campa HC, Varcárcel M. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann.* 1991; 14(2):195-207.
45. Jiang Q, Akashi S, Miyake K, Petty HR. Cutting Edge: Lipopolysaccharide induces physical proximity between CD14 and Toll-like receptor 4 (TLR4) prior to nuclear translocation of NF-KB. *J Immunol.* 2000; 165:3541-4.
46. Massari P, Henneke P, Ho Y, Latz E, Golenbock DT, Wetzler LM. Cutting Edge: Immune Stimulation by Neisserial Porins Is Toll-Like Receptor 2 and MyD88 Dependent. *J Immunol.* 2002;168(4):1533-7.
47. Dixon Garth LJ, Newton PJ, Chain BM, Katz D, Andersen SR, Wong S, et al. Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: Interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteri. *Infect Immun.* 2001; 69(7):4351-7.
48. Pollard AJ, Frasch CE. Development of natural immunity to *Neisseria meningitidis*. *Vaccine.* 2001;19:1327-46.
49. del Campo JD, Zayas C, Romeu B, Acevedo R, Gonzalez E, Bracho G, et al. Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from *Neisseria meningitidis* serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods.* 2009; 49(4):301-8.
50. Pérez O, Lastre M, Lapinet J, Bracho G, Padrón J, Díaz M, et al. Immune Response Induction and New Effector Mechanisms Possibly Involved in Protection Conferred by the Cuban Anti-Meningococcal BC Vaccine. *Infect Immun.* 2001; 69(7):4502-8.

51. Kolb-Maurer A. Interaction of *Neisseria meningitidis* with human dendritic cells. *Infect Immun.* 2001; 69:6912–22.
52. Milagres LG, Ramos SR, Sacchi CT, Melles CE, Vieira VS, Sato H, et al. Immune response of Brazilian children to a *Neisseria meningitidis* serogroup B outer membrane protein vaccine: comparison with efficacy. *Infect Immun.* 1994; 62:4419-24.
53. Rodríguez T, Pérez O, Ménager N, Ugrinovic S, Bracho G, Mastroeni P. Interactions of proteoliposomes from serogroup B *Neisseria meningitidis* with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvant effects and antigen delivery. *Vaccine.* 2005; 23:1312–21.
54. Mora N. Obtención y evaluación preliminar de AFCo1 a partir de Vesículas de Membrana Externa de VA-MENGOC-BC. [Tesis de diploma]. La Habana: Universidad de la Habana; 2001.
55. Bracho G. Capacidad adyuvante de estructuras supramoleculares derivadas de proteoliposomas de *Neisseria meningitidis* B [Doctorado]. Habana: Universidad de la Habana; 2004.
56. Pérez O, Bracho G, Lastre M, del Campo J, Gil D, Zayas C, et al. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *Inmunol Cell Biol.* 2004; 82(6):603-10.
57. Carrere H, René F. Industrial multi-stage continuous filtration process: influence of operating parameters. *J Membrane Sci.* 1996;110: 191-202.
58. Howell JA. Introduction. In: Howell JA, Sánchez V, Field RW, editors. *Membranes in bioprocessing: theory and applications.* London: Chapman & Hall; 1993. p. 203-42.
59. Pérez O, Bracho G, Lastre M, Sierra G, Campa C, Mora N, et al., inventors Método de obtención de estructuras cocleares, composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares. Cuba patent OCPI23313. 2008.
60. del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodríguez T, Gil D, Zayas C, et al. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and proteoliposome as mucosal adjuvants. *Vaccine.* 2006; 24 Suppl 2:S2-50-1.
61. Murtaugh MP, Foss DL. Inflammatory cytokines and antigens presenting cell activation. *Vet Immunol Immunopathol.* 2002; 87:109-12.

62. Cooper PD. The selective induction of different immune responses by vaccine adjuvants. In: G.L. A, editor. Strategies in vaccine desing. Austin. , TX: Landes; 1994. p. 125-58.
63. Ala'Aldeen DA. Current Developments in vaccines against meningococcal disease. Culture. 1997; 18:1-4.
64. Martínez E. Enfermedad meningocócica. fisiopatología, cuadro clínico y pronóstico. Rev Hosp Niños B Aires. 1994 ;158/159:204-14.
65. Pollard AJ, Moxon ER. The meningococcus tamed? Arch Dis Child. 2002;87:13-7.
66. Tsai CM, Frasch CE, Mocca LF. Five structural classes of membrane proteins in *Neisseria meningitidis*. J Bacteriol. 1981; 146:69-78.
67. Bjune G, Høiby EA, Grønnesby JK, Arnesen O, Fredriksen JH, Halstensen A, et al. Effect of outer membrane vesicle vaccine against group B meningococcal disease in Norway. Lancet 1991; 338(8775):1093-6.
68. Cartwright K, Morris R, Rumke H, Fox A, Borrow R, Begg N, et al. Immunogenicity and reactogenicity in UK infants of a novel meningococcal vesicle vaccine containing multiple class 1 (Por A) outer membrane proteins. Vaccine. 1999; 17:2612-9.
69. Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Biset G, García LG, Puentes G, et al., inventors Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. United States patent US 5:597-572. 1997.
70. Padrón J, Bebelagua Y, Lastre M, Lapinet J, Zayas C, Quintero Y, et al. Nitric Oxide participates in the immune response against *Neisseria meningitis* serogroup B. FEMS Immun Med Microbiol. 1999; 25:385-9.
71. Lastre M, Pérez O, Labrada A, Bidot I, Pérez J, Bracho G, et al. Bacterial derived proteoliposome for allergy vaccines. Vaccine. 2006; 24 Suppl 2:S2-34-5.
72. Mesa C, De León J, Rigley K, Fernandez LE. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. Vaccine. 2004; 22(23-24):3045-52.
73. Pérez O, Lastre M, Bracho G, del Campo J, Zayas C, Acevedo R, et al. Natural *Neisseria* derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. PharmacologyOnline. 2006; 3:762-4.

74. Patel GB, H Zhou, A Ponce, W Chen. Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine*, 2007; 25: 8622-8636.
75. Chen W, GB Patel H, Yan, J Zhang. Recent advances in the development of novel mucosal adjuvants and antigen delivery systems *Human Vaccines*.2010; 6: 706-714.
76. Neutra MR, PA Kozlowski. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6:148-158.
77. Belshe RB, Edwards K, Vesikari T, Black SV, Walker RE, Hultquist M, Kemble G, Connor EM. Live attenuated versus inactivated influenza vaccine in infants and young children *N Engl J Med*. 2007; 356: 685-696.
78. Cox N J, C Buxton. Inactivated and live attenuated influenza vaccines in young children — how do they compare? *N Engl J Med*. 2007; 356: 729- 731.
79. Jabbal-Gill I. Nasal vaccine innovation *J Drug Targ*. 2010; 18: 771–786.
80. Jakobsen H, I Jonsdottir. Mucosal vaccination against encapsulated respiratory bacteria-new potentials for conjugate vaccines? *Scand J Immunol*. 2003; 58: 119-128.
81. Holmgren J, C. Bergquist. Oral B subunit killed whole-cell cholera vaccines. In:Levine MM, editor. *New Generation Vaccines*. New York. 2004; 499-510.
82. Lucas ME, JL,Deen, L Von Seidlein, XY Wang , et al. Effectiveness of mass oral cholera vaccination in Beira, Mozambique. *N Engl J Med*. 2005; 352: 757-767.
83. Kataoka K, Fujihashi K. Dendritic cell targeting DNA based mucosal adjuvants for the development of mucosal vaccines. *Expert Rev Vaccines*. 2009; 8(9):1183-93.
84. Fujihashi K, Koga T, Van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee JR. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin-based adjuvants. *Vaccine*. 2002; 20:2431-8.
85. Simmons CP, Mastroeni P, Fowler R, Ghaem-maghami M, Lycke N, Pizza M, et al. MHC Class I - Restricted Cytotoxic Lymphocyte Responses Induced by Enterotoxin-Based Mucosal Adjuvants *The Journal of Immunology* 1999; 163:6502-10.
86. Klinman DM, S Klaschik, T Sato, D Tross. CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases. *Adv Drug Del Rev*. 2009; 61: 248-255.

87. Ko SY, HJ Ko, WS Chang, SH Park, MN Kweon. alpha- Galactosylceramide can act as a nasal vaccine adjuvant inducing protective immune responses against viral infection and tumor. *J Immunol.* 2005; 175: 3309-3317.
88. Christensen , C Foged, I Rosenkrands, CV Lundberg , P Andersen , EM Agger , HM Nielsen. CAF01 liposomes as a mucosal vaccine adjuvant: In vitro and in vivo investigations. *Int J Pharm.* 2009; 390: 19-24.
89. Pérez O, G Bracho, M Lastre, C Zayas., D González, et al. Proteliposome-derived Cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. *Vaccine.* 2006; 24: 53-54.
90. del Campo J, Lindqvist M, Cuello M, Cabrera O, Persson J, Pérez O, et al. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. *Vaccine* 2010; 28(5):1193-200
91. Papahadjopoulos D, Poste G, Schaeffer BE, Vail WJ. Membrane fusion and molecular segregation in phospholipid vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1974;352(1):10-28.
92. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Jacobson K, Poste G. Cochleate lipid cylinders: formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochim Biophys Acta.* 1975 3;394(3):483-91.
93. Zarif L. Elongated supramolecular assemblies in drug delivery. *J Control Release.* 2002; 81(1-2):7-23. PubMed PMID: 11992674.
94. Coorssen JR, Rand P. Structural effects of neutral lipids on cation- induced interactions of Phosphatidylserine-containing bilayers. *Biophys J.* 1995;68:1009-18.
95. Papahadjopoulos D, Vail WJ, Newton C, Nir S, Jacobson K, Poste G, et al. Studies on membrane fusion. The role of calcium induced phase changes. *Biochim Biophys Acta.* 1977; 465:579-98.
96. Racker E. Reconstitution of cytochrome oxidase vesicles and conferral of sensitivity to energy transfer inhibitors. *J Membr Biol.* 1972; 10:221-35.
97. Gregoriadis G. *Liposome Technology: Interactions of Liposomes with the Biological Milieu.* 3er ed 2007.

98. Mannino RJ, Canki M, Feketeova E, Scolpino AJ, Wang Z, Zhang F, et al. Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998; 32(3):273-87.
99. Marone PA, Elsmore SK, Sandulow J, Mannino RJ. Structural Determinants of divalent Cation-Induced Phosphatidylserine Cochleate Crystallization. *Microsc Microanal.* 2005; 11(Suppl 2):1244-5.
100. Acevedo R, Perez O, Zayas C, Pérez JL, Callicó A, Cedre B, et al. Cochleates derived from *Vibrio cholerae* O1 Proteoliposomes: The Impact of Structure Transformation on Mucosal Immunisation. *PLoS ONE.* 2012; 7(10): e46461.
101. Acevedo R, Callicó A, del Campo J, González E, Cedré B, González L, et al. Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods.* 2009; 49(4):309-15.
102. Zarif L, Graybill JR, Perlin D, Mannino RJ. Cochleates: natural and synthetic sphingolipids, new lipid-based drug delivery system. *J Liposome Res.* 2000; 10(4):523–38.
103. Zarif L, Mannino RJ. Cochleates. Lipid-based vehicles for gene delivery-concept, achievements and future development. *Adv Exp Med Biol.* 2000; 465:83-93.
104. Zarif L. Drug delivery by lipid cochleates. *Methods Enzymol.* 2005;391:314-29.
105. Gould-Fogerite S, Kheiri M, Zhang F, Mannino R. Cochleate delivery vehicles applications in vaccine delivery. *J Liposome Res.* 2000; 10(4):339-58.
106. Bracho G, Zayas C, Wang L, Coppel R, Pérez O, Petrovsky N. AFCo1, a meningococcal B-derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against Plasmodium falciparum merozoite surface protein 4 and 5. *Malar J.* 2009;8:35.
107. Howel JA, Nystrom M. Fouling phenomena. In: Howel JA, Sánchez V, Field RW, editors. *Membranes in bioprocessing: theory and applications.* New York: Chapman & Hall; 1993. p. 203-42.
108. Samuelson G, Huisman IH, Tragard G, Paulsson M. Predicting limiting flux of Skim milk in cross-flow microfiltration. *J Membrane Sci.* 1997; 129:277-81.
109. Hong S, Faibish RS, Elimelech M. Kinetics of permeate flux decline in cross-flow membrane filtration of colloidal suspensions. *J Colloid Interf Sci.* 1997;196:267-77

110. Gautam D, Heather B, Chen Y. Comparison of Diafiltration and Tangential Flow Filtration for Purification of Nanoparticle Suspensions. *Pharmaceutical Research*. 2005; 22(12):2152-62.
111. Schwartz L and Seeley K. Introduction to Tangential Flow Filtration for Laboratory and Process Development Applications, Pall Life Sciences, Ann Arbor, 2002, pp. 1Y12.
112. Mora D, Dominguez R, Duque R, Martínez L, Escoto J, Jacobo O. Adyuvantes: un desafío en el ámbito regulatorio. La Habana: Servicio Informativo del Centro para el Control Estatal de la Calidad de los Medicamentos; 2007.
113. Morefield GL. A rational, systematic approach for the development of vaccine formulations. *The AAPS journal*. 2011; 13(2):191-200.
114. Manning MC, Patel K, Borchardt RT. Stability of protein pharmaceuticals. *Pharm Res*. 1989; 6:903-18.
115. Chang LL, Pikal MJ. Mechanisms of protein stabilization in the solid state. *J Pharm Sci*. 2009; 98(9):2886-908.
116. Clausi AL, Merkley SA, Carpenter JF, Randolph TW. Inhibition of aggregation of aluminum hydroxide adjuvant during freezing and drying. *J Pharm Sci*. 2008; 97(6):2049-61.
117. Aguilar JC, Leal MJ. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biotecnología Aplicada*. 2000; 17:147-60.
118. European Medicines Agency: Committee for proprietary medicinal products (CPMP). Note for guidance on preclinical pharmacological and toxicological testing of vaccines. Report no.: CPMP/SWP/465/95 1997 [cited 2013 Jul 23 2013]. Available from: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/swp/046595en.pdf>.
119. Food and Drug Administration (FDA): Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). Guidance for Industry for the Evaluation of Combination Vaccines for Preventable Diseases: Production, Testing and Clinical Studies 1997 [cited 2013 Jul 23 2013]. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM175909.pdf>.

120. World Health Organisation. WHO guidelines on nonclinical evaluation of vaccines 2013. Available from: <http://www.who.int/biologicals/publications/nonclinicalevaluationvaccinesnov2013.pdf>.
121. European Medicines Agency: Committee for medicinal products for human use (CHMP). Guideline on adjuvants in vaccines for human use. Report no.: EMEA/CHMP/VEG/134716 2005. Available from: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/human/vwp/13471604en.pdf>.
122. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-70.
123. Fiske CN, Subarrow Y. Colorimetric determination of phosphorous. *J Biol Chem.* 1925; 66:375.
124. Xiaozhong Qu WW, Gray AI, Tetley L, Uchegbu IF. Self-Assembly of Cetyl Linear Polyethylenimine To Give Micelles, Vesicles, and Dense Nanoparticles *Macromolecules* 2004; 37(24):9114-22.
125. Laemmli NK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-5.
126. Burnette WN. Western Blotting electrophoretic transfer of protein from sodium dodecyl sulphate polyacrilamide gel to a modified nitrocelulose and radiographic detection with antibodies and radiodinated protein A. *Anal Biochem* 1980; 112:192-200.
127. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 86/609, OJ L 358 Geneva: EEC Council Directive; 1987.
128. Hernández R. La experimentación animal en Neurobiología y Neurociencias In: Acosta Sariego JR, editor. *Bioética; desde una perspectiva cubana*. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 1997. p. 73-8.
129. Ochoa R, Martínez JC, Ferriol X, Estrada E, García AM, Blanco R. Guía para la estandarización de técnicas inmunoenzimáticas en ensayos de vacunas. *VacciMonitor.* 2000; 9(3):13-8.
130. Prasad K. And Singh, S. A new method for spectrophotometric determination of thiomersal in biologicals. *Biologicals*, 1995, 23, 65-69,

131. Diéguez R Tesis para optar por el título de Master en Tecnología y control de Medicamentos. Desarrollo y validación de la técnica de Wester Blot de las vacunas antimeningocócicas Men B y VA-MENGOC BC®, 2008.
132. Code of Federal Regulations, FDA . 2012, Title 21, Part 610.
133. Farmacopea de los Estados Unidos, USP 26- NF 21. 2003.
134. OECD. Guidelines for Testing of Chemicals. Paris: Organization for Economic Cooperation and Development; 1993. p. 407.
135. ISO. Norm Part 10. Test for irritation and delayed hypersensitivity. Biological Evaluation of Medical Devices, ISO 10993/10 (2002).
136. Guilherme L, Faé KC, Oshiro SE, Kalil J. Towards a vaccine against rheumatic fever. Clin Immunol Dev. 2006; 13:125-32.
137. Sigarrosa A. Biometría y diseño experimental. Parte I y II. La Habana, Cuba: Ministerio de Educación Superior; 1985.
138. Gould-Fogerite S, Kheiri MT, Zhang F, Wang Z, Scolpino AJ, Feketeova E, Canki M and Mannino RJ. Targeting immune response induction with cochleate and liposome based vaccines. Advanced Drug Delivery Reviews. 1998; 32:273-287.
139. Bracho G, Lastre M, del Campo J, Zayas C, González D, Gil D, et al. Proteoliposome derived cochleate as novel adjuvant. Vaccine. 2006; 24 Suppl 2:S2-30-1.
140. Mannino RJ, Gould-Fogerite S. Antigen cochleates preparation for oral and systemic vaccination. In New generation vaccine. 2nd edition. Edited by Myron M. Levine et al. Marcel Dekker, New York. 1997; 229-238. ISBN 0-8247-0061-1-9.
141. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1998; 95:588-93.
142. Bouvet J, Decroix N, Pamonsinlapatham P. Stimulation of local antibody production: parenteral or mucosal vaccination? TRENDS in Immunology. 2002; 23(4):209-213.
143. Neurath M F, Finotto S, Glimcher L. The role of Th1 / Th2 polarization in mucosal immunity. Nature Medicine. 2002; 8 (6):567-573.

144. Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev.* 2003; 8(3):223-246.
145. Romagnani S. Human Th1 and Th2 subsets: "eppur si muove"! . *Eur Cytokine Netw.* 1994; 5(1):7-12.
146. Allen JE, Maizels RM. Th1-Th2: reliable paradigm or dangerous dogma? *Immunology Today.* 1997; 18(8):387-392.
147. Seljelid R, Eskeland T. The biology of macrophages: I. General principles and properties. *Eur J Haematol.* 1993; 51(2):267-75.
148. IABS International Scientific Workshop. *Stability Evaluation of Vaccines. A life Cycle Approach*, 2008.
149. Sutkowski EM. Non Clinical Safety assessment of Preventive Vaccines, the FDA Perspective. In: *Proceeding of the Workshop on Non Clinical Safety Evaluation of the Preventive Vaccines: Recent Advances and Regulatory Considerations. Vol.1.* Washington, DC; 2002.p. 203-282.
150. Ledwith B. The Relevance of Animal Studies for Non-Clinical Safety Assessment of Vaccines In: *Proceeding of the Workshop on Non Clinical Safety Assessment of Preventive Vaccines: Recent Advances and Regulatory Considerations Vol 1.* Washington, D.C. 2002. p 546-6666.
151. Canadian Council on Animal Care. *Laboratory rats. Guide to the care and use of experimental animals. Vol. 2.* Ottawa, Ontario; 1993, .p 175-187.
152. Sosa E, Sifontes S, Infante JF, Diaz D, López Y, Pérez V, et al. Local tolerance of the vax-Tyvi® vaccine in Sprague Dawley rats. *VacciMonitor* 2005; 14(1):21-27.
153. Infante JF, Sifontes S, González P, Muñoz E, Martínez A, Fariñas M, et al. Toxicidad de VA-DIFTET por administración a dosis repetida en ratones. *VacciMonitor* 2005; 10(2):13-8.
154. Infante JF, Sifontes S, Álvarez E, González M, Pérez V, Sosa E, et al. Single dose toxicity and local tolerance evaluation of the vax-SPIRAL® vaccine in Sprague Dawley rats. *VacciMonitor* 2004; 13 (2): 11-16.
155. López Y, Sifontes S, Infante JF, Díaz D, Obaya M, Alvarez E, et al. Evaluación de la toxicidad por dosis única de la vacuna antidiftérica-antitetánica en ratas Sprague Dawley. *VacciMonitor* 2005; 14(2):1-6.

156. Marttin E, Nicolas GM. Nasal mucocilliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1998; 29:865-885
157. Zeitlin P, Boyle P, Guggino W, Molina L. A Phase I Trial of Intranasal Moli1901 for Cystic Fibrosis American College of Chest Physiocians 2004; 125:143-9.
158. Kuck D, Lau T, Leuchs B, Kern A, Müller M, Gissmann L, Kleinschmidt J, Intranasal Vaccination with Recombinant Adeno-Associated Virus Type 5 against Human Papillomavirus Type 16 L1. *Journal of Virology* 2006; 80:2621-2630.
159. Illum L. Nasal drug delivery--possibilities, problems and solutions. *J Control Release* 2003, 87, 187-198.
160. Repetto G, Zurita JL, Jos A, del Peso A, Salguero M , Ríos JC , Repetto M. Modelos Alternativos in vitro para el Estudio y la Evaluación de Neurotoxicidad. *Revista de Toxicología*. 2005, 228(1): 12-16.
161. World Health Organization. WHO Guidelines on Nonclinical Evaluation of Vaccines. WHO Technical Report Series. Adopted by the 54th meeting of the WHO Expert Committee on Biological. Standardization, 17-21, November 2003.
162. Sifontes S, Infante JF, Díaz D, López Y, Pérez M, Sosa E, et al Repeated dose toxicity study of leve attenuated oral Cholera vaccine in Sprague Dawley rats. *Arch. Med. Res.* 2009; 40: 527-535.
163. Pritchett KR, Coming BF. Biology and Medicine of rats: In: *Laboratory Medicine and Management*, Rueter JD and Suckow MA, editors. International Veterinary Information Service, Ithaca NY, 2004; B2503.0904 (Last Update: 29-sep-2004). Disponible en: URL: www.ivis.org.
164. Johansen FE, Baekkevold ES, Carsen HS, Farstad IN, Soler D, Brandtzaeg P. Regional induction of adhesion molecules and chemokine receptors explains disparate homing of human B cells to systemic and mucosal effectors sites: Dispersion from tonsils. *Blood* 2005; 106: 593-600.
165. Wlaf JL. The Membranaus epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med.* 1984; 35:95-112.
166. López Y, Infante JF, Sifontes S, Díaz D, Pérez V, Año G, Henández T, et al Pharmacology and toxicology of an oral tablet whole cells inactivated cholera vaccine in Sprague Dawley rats. *Vaccine*. 2011; 29: 3596-3599.

- 167 Fujihashi K, Kato H, van Ginkel FW, Koga T, Boyaka PN, Jackson RJ, et al. A revisit of mucosal IgA immunity and oral tolerance. *Acta Odontol Scand.* 2001;59(5):301-308.
168. Huber VC, RM McKeon, MN Brackin, LA Miller, R Keating, SA Brown, N Makarova, DR Perez, GH Macdonald, JA McCullers. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccine Immunol.* 2006.; 13: 981-990.
169. Wilson JA, M. Hevey, R. Bakken, S. Guest, M. Bray, AL. Schmaljohn, MK. Hart. Epitopes involved in antibody-mediated protection from Ebola virus. *Science.* 2000. 287: 1664-1666.
170. Goodman J. Inmunoglobulinas I: Estructura y función. En: Stites D, Stobo J, Fudenberg H, Wells J. (eds.). *Inmunología Básica y Clínica.* Editorial Científico Técnica 5ta ed. Ciudad de la Habana. . 1995, 22-35.
171. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunology today.* 1997;18(6):263-266.
172. Brandtzaeg P. Do Salivary Antibodies Reliably Reflect Both Mucosal and Systemic Immunity? *Ann N Y Acad Sci.* 2007, 1098: 288-311. doi: 10.1196/annals.1384.012
173. Takeda K, T. Kaisho, S. Akira, *Annu. Rev. Immunol.* 2003; 21:335–376.
174. Mosmann TR, RL Coffman. Th1 and Th2 cell: different pattern of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989; 7:145-73.
175. Abbas AK., Lichtman AH. and Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*, 7th Edition 2012.
176. Brandtzaeg P. Mucosal Immunity: Induction, Dissemination, and Effector Functions. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2009; 70, 505–515

IX. PRODUCCION CIENTIFICA DEL AUTOR

- Artículos que avalan los resultados y el tema de tesis:

- **Zayas C**, Tobar, Tobar J, Lastre M, Arencibia D, Velásquez L, Pérez O. Título: Evaluación citotóxica de Adyuvantes Finlay en células de fibroblasto de embrión de pollo y de salmón. Retel. www.serotox.com.ar/retel. 30-46
- **Zayas C**, Bracho G, Lastre M, González D, Gil D, Acevedo R, del Campo J, Taboada C, Solis RL, Barbera R, Pérez O. Scale up of proteoliposome derived Cochleate production. Vaccine 2006 Apr 12;24Suppl 2:S2-94-5
- **Zayas C**, González D, Reinaldo Acevedo, del Campo J, Lastre M, González E, Romeu B, Cuello M, Balboa J, Cabrera O, Guilherme L, Pérez O. Pilot scale production of the vaccine adjuvant Proteoliposome derived Cochleates (AFCo1) from *Neisseria meningitides* serogroup B. BMC Immunology 2013, 14(Suppl 1):S4.
- del Campo J, Lastre M, Bracho G, Rodríguez T, Gil D, **Zayas C**, Taboada C, Acevedo R, and Pérez O. Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and Proteoliposome as mucosal adjuvants Vaccine. 2006; 12;24Suppl 2:S2-50-1
- Gil D, Bracho G, **Zayas C**, del Campo J, Acevedo R, Toledo A, Lastre M and Pérez O. Strategy for determination of an efficient cochleate particle size. Vaccine 2006 Apr 12; 24 Suppl 2:S2-92-3
- Bracho G, Lastre M, del Campo J, **Zayas C**, González D, Gil D, Acevedo R, Taboada C, Solis RL, Pérez O. Proteoliposome derived cochleate as novel adjuvant. Vaccine. 2006 Apr 12;24Suppl 2:S2-30-1
- Pérez O, Bracho G, Lastre M, **Zayas C**, Gonzalez D, Gil D, del Campo J, Acevedo R, Taboada C, Rodríguez T, Fajardo ME, Sierra G, Campa C, Mora N, Barbera R, Solis RL. Proteliposome-derived Cochleate as an immunomodulator for nasal vaccine. Vaccine 2006 Apr 12;24Suppl 2:S2-52-3
- Pérez O, Lastre M, Bracho G, del Campo J, **Zayas C**, Acevedo R, Gil D, Mora N, González D, Balboa J, Cabrera O, Cuello C, Pérez DR, Barberá R, Fajardo EF, Sierra G, Solís RL, Campa C. Natural Neissera derive proteoliposome and cochleate as potent vaccine adjuvants. Pharmacology Online 3:762-64, 2006

- Infante JF, Sifontes S, Pérez V, Bracho G, Hernández T, **Zayas C**, López Y, Díaz D, Acevedo R, Rodríguez N, Lastre M, Fariñas M, Del Campo Y, Ponce A, Pérez O. Ensayo de inmunogenicidad y toxicidad local del cocleato de *Neisseria meningitidis* en ratas Sprague Dawley. *Vaccimonitor* 18 (1):1-7, 2010
- Pérez O, Bracho G, Lastre M, González D, del Campo J, **Zayas C**, Acevedo R, Barberá R, Sierra G, Labrada A, Campa C. Proteoliposome nanoparticle for vaccine adjuvants. Chapter 10, in *Bionanotechnology: Global Prospective*. Ed. Reisner DE. Editorial CRC Press, Taylor and Francis Group. Pag.123-130, 2008.

Otros artículos relacionados con el tema:

- Bracho G, **Zayas C**, Wang L, Ross Coppel R, Pérez O and Petrovsky N. AFCo1, a meningococcal B-derived cochleate adjuvant, strongly enhances antibody and T-cell immunity against *Plasmodium falciparum* merozoite surface protein 4 and 5. 2009. *Malaria Journal* 2009, 8:35.
- Acevedo R, Callicó A, del Campo J, González E, Cedré B, González L, Romeu B, **Zayas C**, Lastre M, Fernández S, Oliva R, García L, Pérez JL, Pérez O. Intranasal administration of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods* 49 (2009) 309–315
- Pérez O, Bracho G, Lastre M, Mora N, del Campo J, Gil D, **Zayas C**, Acevedo R, González D, López JA, Taboada C, Solis RL. Novel adjuvant based on a proteoliposome-derived cochleate structure containing native lipopolysaccharide as a pathogen-associated molecular pattern. *ImmunolCell Biol.* 2004; 82(6):603-10
- Pérez O, Lastre M, Cabrera O, del Campo J, Bracho G, Cuello M, Balboa J, Acevedo R, **Zayas C**, Gil D, Mora N, González D, Pérez R, Gonzalez E, Barbera R, Fajardo EM, Sierra G, Solis RL, Campa C. New Vaccines Require Potent Adjuvants like AFPL1 and AFCo1. *Scandinavian Journal of Immunology* 2007; 66, 271–277.
- Acevedo R, Romeu B, del Campo J, González E, Balboa J, **Zayas C**, Cuello M, Cabrera O, Lastre M, Ferro VA, Pérez O. Adjuvants: an essential component of *Neisseria* Vaccines. *Vaccimonitor* 18 (2): 93-95, 2009.

- Balboa J, Romeu B, Cuello M, **Zayas C**, del Campo J, González E, Acevedo R, Lastre M, Cabrera O, Pérez O. Intranasal immunization with AFCo1 induce systemic, mucosal and memory immune response in neonatal mice. *Vaccimonitor* 18 (2):81-83, 2009.
- Pérez O, del Campo J, Cuello M, González E, Nuñez N, Cabrera O, Llanes R, Acevedo R, **Zayas C**, Balboa J, Romeu B, Baró M, Campa C, Sierra G, Galindo MA, Labrada A, Guilherme L, Harandi AM, and Lastre M. Mucosal approaches in *Neisseria* Vaccinology. *Vaccimonitor* 18 (2):55-57, 2009.
- del Campo JM, Lastre M., **Zayas C**, Acevedo R., González E., Romeu B., Cuello M., Cabrera O., Balboa J., Harandi A, Pérez O. Mucosal immune response induced by proteoliposome and cochleate derived from serogroup B *N. meningitidis*. *Vaccimonitor* 18 (2):71-74, 2009.
- González E, Romeu B, del Campo J, Acevedo R, Lastre M, **Zayas C**, Cuello M, Cabrera O, Balboa J, Valdez Y, Fariñas M, and Pérez O. Mucosal and systemic immune response against *Neisseria meningitidis* B induced by single time vaccination strategy. *Vaccimonitor* 18 (2):75-77, 2009.
- del Campo J, **Zayas C**, Romeu B, Acevedo R, González E, Bracho G, Cuello M, Cabrera O, Balboa J, Lastre M. Mucosal immunization using proteoliposome and cochleate structures from *Neisseria meningitidis* serogroup B induce mucosal and systemic responses. *Methods* 49 (2009) 301–308. .
- L. Guilherme, E. Postol, S. Freschi de Barros, F. Higa, R. Alencar a,b, M. Lastre, **C. Zayas**, C.R. Puschel, W.R. Silva, L.C. Sa-Rocha, V.M. Sa-Rocha, O. Pérez, J. Kalil. A vaccine against *S. pyogenes*: Design and experimental immune response. *Methods* 49 (2009) 316–321.
- Cochleates derived from *Vibrio cholerae* O1 proteoliposomes: The impact of structure transformation on mucosal immunization. Acevedo R, Pérez O, **Zayas C**, Pérez JL, Callicó A, Cedré B, García L, Mckee D, Mullen A, Ferro VA. *PLoS ONE*. 2012;7(10): e46461.
- Acevedo R, Romeu B, **Zayas C**, González E, Lastre M, del Campo J, Mullen A, Ferro VA, Pérez O. In vitro study of protein release from AFCo1 and implications in mucosal immunization *VacciMonitor* 2012; 21(2):1-5.

- Cuello M, Nuñez N, Cabrera O, Acevedo R, del Campo J, Lastre M, **Zayas C**, González E, Balboa J, Romeu B, Thörn K, Lindqvist M, Persson J, Harandi AM, and Pérez O. Nasal immunization with AFCo1 induces recognition of N. Gonorrhoea. *Vaccimonitor* 18 (2):78-80, 2009.
- Belkis Romeu, Elizabeth González, **Caridad Zayas**, Judith del Campo, Reinaldo Acevedo, Maribel Cuello, Yolanda Valdés, Julio Balboa, Osmir Cabrera, Miriam Lastre, Oliver Pérez. AFCo1 as nasal adjuvant of capsular polysaccharide from *Neisseria meningitidis* serogroup C induces systemic and mucosal immune responses. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2011; 43: 809–813.
- Belkis Romeu, Elyzabeth González, Judith del Campo, Reynaldo Acevedo, **Caridad Zayas**, Yolanda Valdés, Osmir Cabrera, Maribel Cuello, Julio Balboa, Miriam Lastre, and Oliver Pérez. Mucosal and systemic immune responses of mice to tetanus toxoid coadministered nasally with AFCo1. *Can. J. Microbiol.* 57: 256–261 (2011).
- Oliver Pérez, Belkis Romeu, Judith del Campo, **Caridad Zayas**, Miriam Lastre. Proteoliposome and Polysaccharide-Based Meningococcal Vaccine Are Immunogenic in Infants and Toddlers and Primes for Memory against Serogroup C Polysaccharide. *World Journal of Vaccines*, 2013, 3, 77-87
- O. Pérez, A. Batista-Duharte, E. González, **C. Zayas**, J. Balboa, M. Cuello, O. Cabrera, M. Lastre, V.E.J.C. Schijn3. Human prophylactic vaccine adjuvants and their determinant role in new vaccine formulations. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2012 45:ISSN 0100-879X
 - Meeting Report 2nd International Workshop on Vaccine Adjuvants and Glycoconjugates, Varadero, Cuba, April 11th to 15th 2004. *Vaccine*. PérezO, et al.

Premios:

- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Desarrollo Conclusión de la fase experimental del candidato a vacuna nasal anti *Neisseria meningitidis* B. Lastre M, **Zayas C** y cols, 2004.

- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Desarrollo Cocleatos obtenidos de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* B como adyuvante, Pérez O y cols., 2004.
- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo Desarrollo Proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* B como modulador de la respuesta alérgica. Lastre M, **Zayas C** y cols., 2004.
 - Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Desarrollo Mecanismos que explican la capacidad adyuvante de las vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* B. Rodríguez T y cols., 2004.
- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo: AFCo1 induce respuesta mucosal local y a distancia, del Campo J y cols. , 2005
- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo Cocleato como adyuvante del antígeno de superficie de Hepatitis B. **Zayas C**, Bracho G, Pérez O, Lastre M, Petrovsky N, 2006.
- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo Cocleato como adyuvante para antígenos de malaria. Bracho G; Petrovsky N, Pérez O, **Zayas C**, Acevedo R, Lastre M, del Campo J, 2006.
- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo Capacidad adyuvante del Cocleato y del Proteoliposoma contra la proteína recombinante gD del Virus Herpes Simple tipo 2. del Campo J, Pérez O, O'HaganD, Lastre M, Bracho G, **Zayas C**, Acevedo R y Harandi AM, 2006.
- Logro del Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Desarrollo de una formulación mucosal contra herpes simple tipo 2, del Campo J y cols., 2007.
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Adyuvación de antígenos de *Streptococcus β hemolítico* grupo A. Lastre M, **Zayas C**, Gilherme L, Freschi de Barrio S, Acevedo R, Pérez O, 2007.
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Diseño y evaluación de un nuevo adyuvante mucosal en forma de Cocleato. Pérez O, del Campo J, Lastre M, **Zayas C**, Acevedo R, 2008.

- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: El AFCo1 es estable a 4°C durante 24 meses. Lastre M, Pérez O, Pérez E, del Campo J, **Zayas C** y cols., 2008.
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Estrategia de Vacunas Unitemporales. González E, Pérez O, Romeu B, del Campo J, Acevedo R, Lastre M, **Zayas C** y cols., 2008.
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Nuevo proceso de ciclo cerrado para la obtención del AFCo1. **C Zayas** y cols., 2010.
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Avances en la caracterización estructural del AFCo2 y evaluación de su efecto adyuvante sobre el polisacárido Vi de *Salmonella Typhi*. Acevedo R y cols., 2010
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Obtención y caracterización de vesículas de membrana externa derivadas de *Neisseria meningitidis* serogrupo X. **C Zayas** y cols., 2011.
- Logro de Instituto Finlay correspondiente al trabajo: Evaluación de formulaciones vacunales contra los serogrupos A, W135 y X de *Neisseria meningitidis*. **C Zayas** y cols., 2012

Patentes

- **Patentes Concedida:** Certificado No: 23313 Resolución: 2690/2008. Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. Oliver Pérez, Gustavo Bracho, Miriam Lastre, Gustavo Sierra, Concepción Campa, Néstor Mora, Ramón Barberá, Judith del Campo, Tamara Rodríguez, **Caridad Zayas**, Danay Gil y Carlos Taboada
- Composición vacunal contra las alergias y método para su obtención y empleo en el tratamiento de las mismas. Patentes Concedida: Certificado No: 22983, concedido por resolución No: 1883/2004. Miriam Lastre 40%, Oliver Pérez 15%, Alexis Labrada*15%.Igor Bidot 4%, Jorge Pérez 4%, Gustavo Bracho4%, Judith del Campo4%, Dainerys Pérez 4%, Elisa Facenda*4%, **Caridad Zayas** 4%, Claudio Rodríguez* 2%, Gustavo Sierra 2%.

•Patente Aplicada:

1-Vacunas Unitemporales. Oliver G. Pérez Martín, Elizabeth González Aznar, Belkis Romeu Álvarez, Judith del Campo Alonso, Reinaldo Acevedo Grogues, Miriam SJB Lastre González, **Caridad Zayas Vignier**, Maribel Cuello Pérez, Osmir Cabrera Blanco, Niurys Nuñez Gutiérrez, Julio A Balboa González, WIPO, WO/2010/057447 (PCT)

Premios Nacionales:

1. **Premio anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2009.**

“Diseño, obtención y evaluación de un nuevo adyuvante mucosal en forma de Cocleato”. **Autores principales:** Oliver G Pérez Martín; Judith M del Campo Alonso; Miriam de SJB Lastre González; **Caridad Zayas Vignier** y Reinaldo Acevedo Grogues.

Presentación en eventos:

Orales:

- 2nd Internacional Workshop on vaccine Adjuvants and Glycoconjugates, 2004 Cuba. **Caridad Zayas**, Gustavo Bracho, Miriam Lastre, Domingo González, Danay Gil, Reinaldo Acevedo, Judith del Campo, Carlos Taboada, Rosa L. Solís, Ramón Barbera, Oliver Pérez. Scale up of proteoliposome derived Cochleate production.

Otras:

- ALAI 2002, December, Havana, Cuba

Searching Targets for adjuvant screening. D Gil, R Acevedo, J del Campo, M Lastre, G Bracho, **C Zayas**, T Rodríguez, C Taboada, O Pérez. 6to Congreso ALAI y 3er Congreso Sociedad Cubana de Inmunología, Habana, 9-13, 2002.

- 12th International Congress of Immunology 22-27 of July, 2004. Montreal Canada.

Cochleate Structures from Outer Membrane of *Neisseria meningitidis* B as Novel Adjuvant. Oliver Pérez, Gustavo Bracho, Miriam Lastre, **Caridad Zayas**, Domingo González, Reinaldo Acevedo, Judith del Campo, Danay Gil, Carlos Taboada, T Rodríguez, and Rosa L Solís

- . 2nd International Workshop on Vaccine Adjuvant and Glicoconjugates. Adjuvant 2004

Scale up of proteoliposome derived Cochleate production. **Caridad Zayas**, Gustavo Bracho, Miriam Lastre, Domingo González, Danay Gil, Reinaldo Acevedo, Judith del Campo, Carlos Taboada, Rosa L Solís, Ramón Barberá, and Oliver Pérez

Strategy for determination of an efficient Cochleates particle size. Danay Gil, Gustavo Bracho, **Caridad Zayas**, Judith del Campo Alonso, Reinaldo Acevedo, Arturo Toledo, Miriam Lastre and Oliver Pérez.

Immunological evaluation of bacterial derived Cochleate and Proteoliposome as mucosal adjuvants. Judith del Campo, Miriam Lastre, Gustavo Bracho, Tamara Rodríguez, Danay Gil, **Caridad Zayas**, Carlos Taboada, Reinaldo Acevedo, and Oliver Pérez.

- 2th International Congress on Immunopharmacology 2011, Varadero beach, Matanzas, Cuba.

Pilot scale production of AFCo1 as vaccine adjuvant. **C Zayas**, D González, RA cevedo, J del Campo, M Lastre, E González, B Romeu, M Cuello, J Balboa, O Cabrera, RLSolís, O Pérez

- 4th International Workshop on Vaccine Adjuvants, 2007, Club Amigo Hotel, Varadero, Cuba

Pérez O, del Campo J, **Zayas C**, Acevedo R, Cabrera O, Cuello M, Balboa J, González E, Romeu B, Núñez N, and Lastre M. Finlay's Adjuvant plataform.

- Relevante en el XVI Forum Nacional de Ciencia y Técnica, 2010,

“Avances en la caracterización estructural del AFCo2 y evaluación de su efecto adyuvante sobre el Polisacárido Vi de Salmonella Typhi”. Autores: Reinaldo Acevedo, **Caridad Zayas**, Adriana Callicó, Judith del Campo y colaboradores.

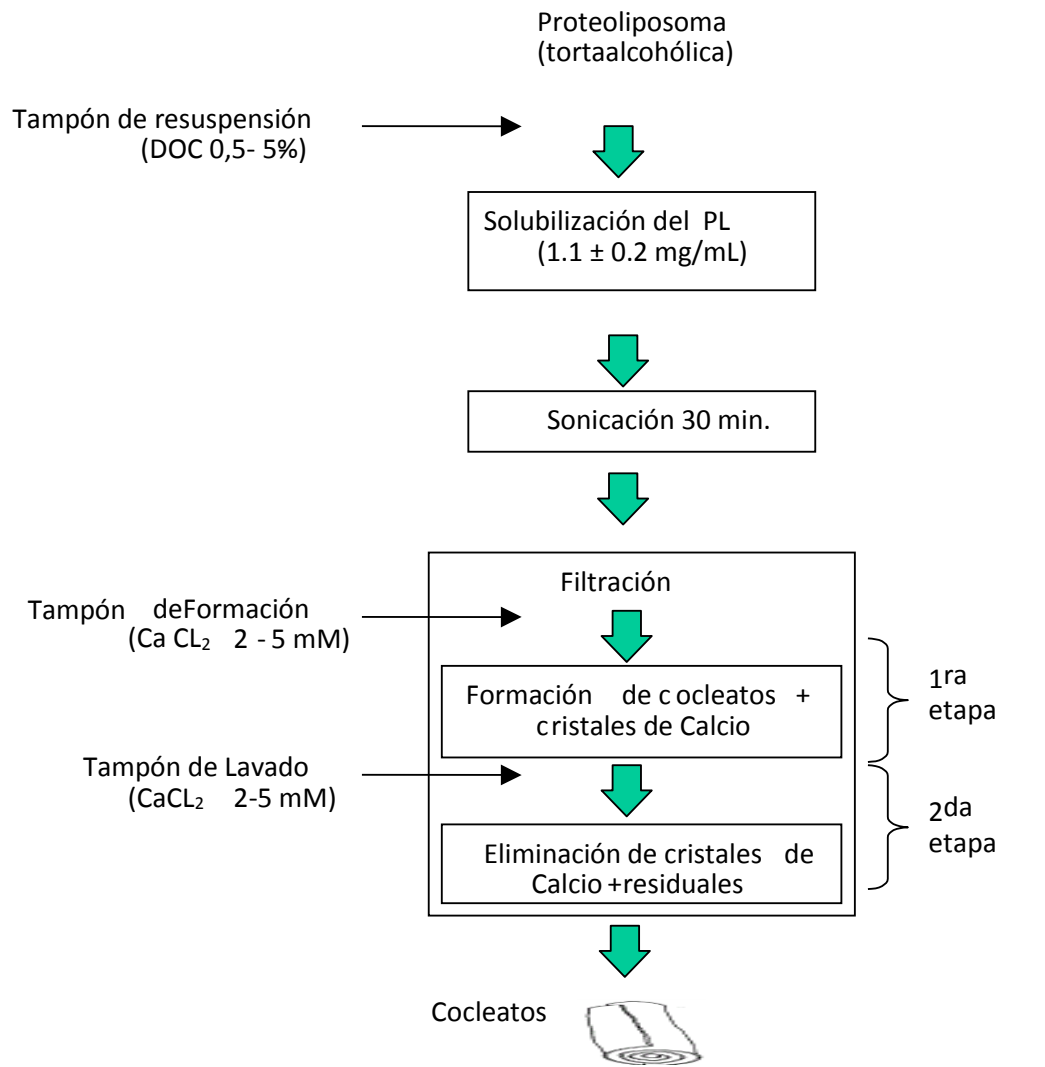


Figura 1. Diagrama del proceso para la obtención de AFCo1 por filtración tangencial utilizando cartuchos de fibra hueca.

Tabla 1. Parámetros operacionales y condiciones de proceso a emplear en el proceso de filtración tangencial.

Presión (formación) (bar)	Presión (lavados) (bar)	No de lavados
0,1 - 0,5	0,1 - 0,5	4 - 14

Tabla 2. Condiciones evaluadas en el procesos de obtención de AFCo1 a partir de Proteoliposoma de *N. meningitidis* mediante filtración tangencial con fibra hueca (modificaciones en los tampones empleados).

Procesos	Resuspensión		Tampón de Formación			Tampón de Lavado	
	Tampón	DOC (%)	Tampón	CaCl₂ (mM)	# de Lavados	Tris(30mM) CaCl₂ (mM)	# de Lavados
P-08-Co/B	Tris	0.5	Tris-NaCL	3	4	2	5
P-09-Co/B	Tris	0.5	Tris-NaCL	3	4	2	6
P-10-Co/B	Tris-NaCL	0.75	Tris-NaCL	4	4	3	6
P-11-Co/B	Tris-NaCL	1	Tris-NaCL	4	4	3	6
P-12-Co/B	Tris	1	Tris-NaCL	4	4	3	6
P-13-Co/B	Tris	1	Tris-NaCL	5	4	3	8

Tampón de Resuspensión (TR): Tris-hidroximetil-aminometano (Tris) 30 mmol/L (Fluka, Suiza); desoxicolato de sodio (DOC, Merck, Alemania).

Tampón de Formación (TF): Tris 30mM, NaCL100 mM (Merck, Alemania); CaCl₂ 5Mm (Fluka, Suiza)

Tampón de Lavado (TL): Tris 30 mM; CaCl₂ 3 mM

Procesos P-14, 15, 16 se realizaron con las mismas condiciones empleadas en el proceso P-13

Tabla 3: Parámetros a evaluar en el estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento reales.

<i>Ensayos a realizar</i>		<i>Límites de Aceptación</i>	<i>T=0</i>	<i>T= 3 meses</i>	<i>T= 6 meses</i>	<i>T= 12 meses</i>
Concentración de proteínas		$1,3 \pm 0,2 \text{ mg/mL}$	No. b 8 S-T	8 S-T	8 S-T	8 S-T
Microscopía óptica	Tamaño de partícula	$\geq 60 \%$ de cocleatos menores de $50 \mu\text{m}$	2 T	2 T	2 T	2 T
	Forma	Estructuras tubulares alargadas				
Apariencia		Suspensión de color blanquecino	3 T	3 T	3 T	3 T
Concentración de Ca^{2+} libre		$\approx 5 \text{ mM}$	6 S	6 S	6 S	6 S
Determinación de pH		6,5 – 7,5	50 T	50 T	50 T	50 T
Identidad SDS-PAGE Western Blot		Dos bandas mayoritarias entre 36 y 46 KDa y minoritarias entre 70 y 85 KDa	2 T	2 T	-	-
Microscopía electrónica (Barrido)		Múltiples capas	1 T	-	-	-
Inmunogenicidad	IgA anti VME en saliva	IgA anti VME > 250 UA/mL	2 T	2 T	2 T	2 T
	IgG anti VME en suero	Seroconversión de IgG anti VME				
Cuantificación de Preservo		0,45 - 0,65 %	2 T	2 T	-	-
Límite microbiano		- < 10^2 bacterias aerobias o 10 hongos / mL - < 10 Enterobacterias o bacterias Gram -/mL - Ausencia de Pseudomonas aeruginosa/mL - Ausencia de Staphylococcus aureus/mL	2 T	2 T	2 T	2 T
Efectividad del preservo		- Reducción del crecimiento microbiano < de 2 log a los 14 días - No incremento del crecimiento microbiano de los 14 a los 28 días.	10 T	10 T	10 T	10 T

S: Sobrenadante, T: Total (suspensión). Temperatura de almacenamiento: 2 a 8°C

No. b: Número de bulbos

Tiempo de almacenamiento: 12 meses

Tabla 4: Parámetros a evaluar en el estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento reales.

<i>Ensayos a realizar</i>		<i>Límites de aceptación</i>	<i>T=0</i>	<i>T= 3 meses</i>	<i>T= 6 meses</i>	<i>T= 9 meses</i>	<i>T= 12 meses</i>
Concentración de proteínas		$1,3 \pm 0,2 \text{ mg/mL}$	<i>No b</i> 8 <i>S-T</i>	8 <i>S-T</i>	8 <i>S-T</i>	8 <i>S-T</i>	8 <i>S-T</i>
Microscopía óptica	Tamaño de partícula	$\geq 60 \%$ de cocleatos menores de $50 \mu\text{m}$	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>
	Forma	Estructuras tubulares alargadas					
Apariencia		<i>Suspensión de color blanquecino</i>	3 <i>T</i>	3 <i>T</i>	3 <i>T</i>	3 <i>T</i>	3 <i>T</i>
Concentración de Ca^{2+} libre		$\approx 5 \text{ mM}$	6 <i>S</i>	6 <i>S</i>	6 <i>S</i>	6 <i>S</i>	6 <i>S</i>
Determinación de Ph		6,5 – 7,5	50 <i>T</i>	50 <i>T</i>	50 <i>T</i>	50 <i>T</i>	50 <i>T</i>
Identidad SDS-PAGE Western Blot		<i>Dos bandas mayoritarias entre 36 y 46 KDa y minoritarias entre 70 y 85 KDa</i>	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	-	-	-
Microscopía electrónica (Barrido)		<i>Estructuras tubulares con múltiples capas</i>	1 <i>T</i>	-	-	-	-
Immunogenicidad	IgG anti VME en suero	<i>Seroconversión de IgG anti VME</i>					
Cuantificación de Preservo		0,45 - 0,65 %	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	-	-	-

S: Sobrenadante, **T:** Total **Temperatura de almacenamiento:** $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$

No b: Número de bulbos **Tiempo de almacenamiento:** 12 meses

Tabla 4: Continuación

<i>Ensayos a realizar</i>	<i>Límites de aceptación</i>	<i>T=0</i>	<i>T= 3 meses</i>	<i>T= 6 meses</i>	<i>T= 9 meses</i>	<i>T= 12 meses</i>
Límite microbiano	- $< 10^2$ bacterias aerobias o 10 hongos / mL - < 10 Enterobacterias o bacterias Gramnegativa/mL - Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /mL - Ausencia de <i>Staphylococcus aureus</i> /mL	2 T	2 T	2 T	2 T	2 T
Efectividad del preservio	- Reducción del crecimiento microbiano < 2 log a los 14 días - No incremento del crecimiento microbiano de los 14 a los 28 días.	10 T	10 T	10 T	10 T	10 T

S: Sobrenadante, T: Total

Tabla 5: Parámetros a evaluar en el estudio de estabilidad en condiciones de almacenamiento reales.

<i>Ensayos a realizar</i>		<i>Límites de aceptación</i>	<i>T=0</i>	<i>T= 3 meses</i>	<i>T= 6 meses</i>
Concentración de proteínas		$1,3 \pm 0,2 \text{ mg/mL}$	<i>No b</i> 8 <i>S-T</i>	8 <i>S-T</i>	8 <i>S-T</i>
Microscopía óptica	Tamaño de partícula	$\geq 60 \%$ de cocleatos menores de $50 \mu\text{m}$	2 <i>T</i>	-	-
	Forma	Estructuras tubulares alargadas			
Apariencia		<i>Suspensión de color blanquecino</i>	3 <i>T</i>	3 <i>T</i>	3 <i>T</i>
Concentración de Ca^{2+} libre		$\approx 5 \text{ mM}$	6 <i>S</i>	6 <i>S</i>	6 <i>S</i>
Determinación de pH		6,5 –7,5	50 <i>T</i>	50 <i>T</i>	50 <i>T</i>
Identidad SDS-PAGE Western Blot		<i>Dos bandas mayoritarias entre 36 y 46 KDa y minoritarias entre 70 y 85 KDa</i>	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>
Microscopía electrónica (Criofractura)		<i>Estructuras tubulares con multiples capas</i>	1 <i>T</i>	-	-
Inmunogenicidad	IgG anti VME en suero	<i>Seroconversión de IgG anti VME</i>			
Cuantificación de Preservo		0,45 - 0,65 %	2 <i>T</i>	2 <i>T</i>	-

S: Sobrenadante, **T:** Total.....**Temperatura de almacenamiento: $40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$**

No b: Número de bulbos

Tiempo de almacenamiento: 6 meses

Tabla 5: Cont.

<i>Ensayos a realizar</i>	<i>Límites de aceptación</i>	<i>T=0</i>	<i>T= 3 meses</i>	<i>T= 6 meses</i>
Límite microbiano	<ul style="list-style-type: none"> - < 10² bacterias aerobias o 10 hongos / mL - < 10 Enterobacterias o bacterias Gram -/mL - Ausencia de Pseudomonas aeruginosa/mL - Ausencia de Staphylococcus aureus/mL 	2 T	2 T	2 T
Efectividad del preservio	<ul style="list-style-type: none"> - Reducción del crecimiento microbiano < de 2 log a los 14 días - No incremento del crecimiento microbiano de los 14 a los 28 días. 	10 T	10 T	10 T

S: Sobrenadante, T: Total

Tabla 6: Diseño experimental de los grupos de tratamiento para el ensayo de tolerancia local

Grupo	Tratamiento/ Dosis	Volumen/Tiempo de aplicación a los 0, 5 y 10 días	Tiempo de sacrificio y No. de animales por sexo			
			12 días		17 días	
I	Control (-)	-	M	H	M	H
II	AFCo [*] ₁ 50 µg	20 µL P/F	3	3	3	3
II	AFCo ₁ 100 µg	20 µL P/F	3	3	3	3
IV	AFCo ₁ 200 µg	20 µL P/F	3	3	3	3
V	Control (+) PBS	20 µL P/F	3	3	3	3

AFCo₁: Cocleato, **P/F:** por cada fosa nasal

Tabla 7. Parámetros del proceso P-08-Co/B de filtración tangencial con fibra hueca.

Volumen de trabajo= 2L

Hora	Vo/Vs	Flux (L/hm ²)	P (bar)	Proteínas (reservorio)			Fosfolípidos
				Suspensión	Solución	Precipitado	
18:35	0	33	0,5	0,86	0,86	0,15	
18:51	1	22	0,5	0,59	0,40	0,38	
19:23	2	11	0,3	0,47	0,07	0,49	
20:03	3	12	0,3	0,50	0,11	0,52	
20:37	4	14	0,3	0,38	0,19	0,25	
20:57	5	23	0,5	0,51	0,31	0,20	
21:18	6	25	0,5	0,31	0,14	0,23	
21:35	7	25	0,5	0,26	0,21	0,16	
21:54	8	25	0,5	0,26	0,06	0,23	
22:18	9	25	0,5	0,23	0,09	0,18	

Vo: Volumen inicial/ Vs: Volumen filtración /Flux: Flujo/ P: Presión

Tabla 8. Parámetros del proceso P-09-Co/B de filtración tangencial con fibra hueca.

Volumen de trabajo=2L

Hora	Vo/Vs	Flux (L/hm ²)	P (bar)	Proteínas (reservorio)			Fosfolípidos
				Suspensión	Solución	Precipitado	
11:20	0	4,67	0,1	1,27	1,31	0,13	11,41
11:45	0,5	4,67	0,1				
12:14	1	4,93	0,1	1,10	0,12	1,07	
12:45	1,5	4,67	0,1				
13:14	2	5,33	0,1	1,05	0,12	1,02	
13:45	2,5	5,33	0,1				
14:15	3	5,47	0,1	1,04	0,11	0,99	
14:45	3,5	5,47	0,1				
15:00	4	6,27	0,1	1,03	0,13	0,96	
15:10	4,5	23,47	0,3				
15:21	5	24,93	0,3	1,02	0,12	0,97	
15:33	6	18,00	0,3	0,97	0,13	0,90	
15:42	7	28,67	0,3	0,97	0,12	0,85	
15:50	8	30,67	0,3	0,89	0,11	0,84	
16:03	9	31,33	0,3	0,86	0,13	0,80	
16:14	10	30,67	0,3	0,88	0,14	0,80	
	Final			1,07	0,13	0,95	11,37

Vo: Volumen inicial/ Vs: Volumen filtración /Flux: Flujo/ P: Presión

Tabla 9. Parámetros del proceso P-10-Co/B de filtración tangencial con fibra hueca.

Volumen de trabajo= 2,5L

Hora	Vo/Vs	Flux (L/hm ²)	P (bar)	Proteínas (reservorio)			Fosfolípidos
				Suspensión	Solución	Precipitado	
8:15	0	2,67	0,1	1,01	1,06	0,05	11,91
9:05	0,5	3,20	0,1				
9:55	1	3,20	0,1	0,92	0,08	0,96	
10:40	1,5	4,53	0,1				
11:13	2	4,93	0,1	0,96	0,07	0,96	
11:45	2,5	5,47	0,1				
12:15	3	5,87	0,1	0,94	0,07	0,94	
12:35	4	20,00	0,3	0,98	0,08	0,92	
12:51	5	22,00	0,3	0,98	0,05	0,91	
13:10	6	26,67	0,3	0,98	0,03	0,94	
13:23	7	25,33	0,3	0,96	0,06	0,91	
13:33	8	31,73	0,3	0,94	0,06	0,89	
13:45	9	32,00	0,3	0,92	0,05	0,87	
13:55	10		0,3	0,89	0,03	0,85	12,18

Vo: Volumen inicial/ Vs: Volumen filtración /Flux: Flujo/ P: Presión

Tabla 10. Parámetros del proceso P-11-Co/B de filtración tangencial con fibra hueca.

Volumen de trabajo= 2,5L

Hora	Vo/Vs	Flux (L/hm ²)	P (bar)	Proteínas (reservorio)			Fosfolípidos
				Suspensión	Solución	Precipitado	
8:53	0	3,47	0,1	1,01	0,91	0,13	12,34
9:40	0,5	3,47	0,1				
10:30	1	3,60	0,1	0,70	0,14	0,91	
11:22	1,5	3,47	0,1				
12:07	2	3,73	0,1	0,71	0,18	0,55	
12:52	2,5	3,60	0,1				
13:36	3	3,33	0,1	0,65	0,16	0,57	
14:30	3,5	3,60	0,1				
15:03	4	3,87	0,1	0,85	0,16	0,56	
Toda la noche a 4°C							
8:44	5	6,40	0,2	0,70	0,16	0,66	
9:32	6	7,73	0,2	0,73	0,13	0,71	
10:10	7	7,73	0,2	0,64	0,14	0,75	
10:51	8	8,13	0,2	0,60	0,15	0,51	
11:30	9	9,07	0,2	0,64	0,17	0,77	
12:12	10	8,40	0,2	0,60	0,13	0,57	
	F			0,88	0,08	0,71	11,17

Vo: Volumen inicial/ Vs: Volumen filtración /Flux: Flujo/ P: Presión

Tabla 11. Parámetros del proceso P-12-Co/B de filtración tangencial con fibra hueca.

Volumen de trabajo= 2,5L

Hora	Vo/Vs	Flux (L/hm ²)	P (bar)	Proteínas (reservorio)			Fosfolípidos
				Suspensión	Solución	Precipitado	
8:07	0	3,07	0,1	1,16	1,16	0,05	13.92
8:57	0,5	4,40	0,1				
9:37	1	4,00	0,1	1,07	0,21	0,70	
10:25	1,5	3,47	0,1				
11:14	2	4,00	0,1	1,01	0,07	0,99	
11:53	2,5	4,53	0,1				
12:30	3	4,67	0,1	1,03	0,06	0,95	
13:07	3,5	4,67	0,1	1,02	0,07	0,99	
13:43	4	4,93	0,1	0,97	0,08	0,95	
14:15	4,5	5,20	0,1				
14:45	5	4,93	0,1	0,94	0,13	0,83	
15:15	5,5	5,47	0,1				
15:53	6	5,47	0,1	0,90	0,03	0,87	
16:26	6,5	5,47	0,1				
16:54	7	5,60	0,1	0,88	0,02	0,85	
17:25	7,5	5,60	0,1				
17:51	8	5,87	0,1	0,86	0,01	0,85	
18:17	8,5	6,27	0,1				
18:45	9	6,13	0,1	0,90	0,02	0,85	
19:15	9,5	5,87	0,1				
19:45	10	5,87	0,1	0,89	0,01	0,87	
	Final			1,10	0,04	1,11	14,05

Vo: Volumen inicial/ Vs: Volumen filtración /Flux: Flujo/ P: Presión

Tabla 12. Parámetros del proceso P-13-Co/B de filtración tangencial con fibra hueca.

Volumen de trabajo= 2,5L

Hora	Vo/Vs	Flux (L/hm ²)	P (bar)	Proteínas (reservorio)			Fosfolípidos
				Suspensión	Solución	Precipitado	
8:24	0	3,07	0,1	1,11			17,66
9:10	0,5	3,73	0,1				
10:05	1	3,33	0,1				
10:55	1,5	2,93	0,1				
12:00	2	3,33	0,1				
12:50	2,5	4,00	0,1				
13:37	3	3,20	0,1				
14:37	3,5	2,67	0,1				
15:45	4	3,20	0,1				
Toda la noche a 4°C							
8:10	4	7,33	0,2				
8:30	4,5	7,33	0,2				
8:49	5	8,13	0,2				
9:07	5,5	8,40	0,2				
9:30	6	8,53	0,2				
10:07	7	9,20	0,2				
10:43	8	9,20	0,2				
11:20	9	9,47	0,2				
11:57	10	9,33	0,2				
12:35	11	9,87	0,2				
13:04	12	10,00	0,2				
Final				0,99			16,32

Vo: Volumen inicial/ Vs: Volumen filtración /Flux: Flujo/ P: Presión

Tabla 13. Resultado de los diferentes procesos de obtención de AFCo1 a partir de Proteoliposoma de *N. meningitidis* mediante filtración tangencial con fibra hueca.

Procesos	No de Micropartículas	% Incorporación de proteínas totales	% Incorporación de fosfolípidos	Observaciones
P-09-Co/B	++	79,76	74,14	Bajo número de partículas
P-10-Co/B	+++	81,79	84,99	Adecuado
P-11-Co/B	++	89,79	87,04	Bajo número de partículas
P-12-Co/B	+++	87,23	82,88	Adecuado
P-13-Co/B	++++	89,46	86,66	Óptimo

Tabla 14. Parámetros operacionales y condiciones de procesos finales, fijadas en el **P-13-Co/B**

Presión (formación) (bar)	Flujo de recirculación (formación) (L/hm ²)	Presión (lavados) (bar)	Flujo de recirculación (lavados) (L/hm ²)	No. de lavados
0,1	3 – 4	0,2	7-10	12

Tabla 15. Composición final de tampones empleados en el proceso de FT y número de lavados en cada etapa (**P-13-Co/B**)

Tampón Resuspensión	Tampón Formación	No lav.	Tampón Lavado	No de lav.
Tris 30 mM DOC 1,0%	Tris 30 mM NaCl 100 mM CaCl ₂ 5 mM	4	Tris 30 mM CaCl ₂ 3 mM	12

Tabla 16. Estudio de estabilidad en estante y acelerada de dos lotes de AFCo1 (602 y 603), producidos por filtración tangencial con fibra hueca a escala piloto

Ensayo	Límites	Lotes	2-8°C				30±2 °C					40°C		
			0 m	3	6	12	1 m	3	6	9	12	1 M	3	6
Tamaño (Diafractome tría laser)	≥60% de AFCo1 <50 µm	602	C	-	C	C	-	C	C	C	C	NP	NP	NP
		603	C	-	C	C	-	C	C	C	C	NP	NP	NP
Forma	Estructuras tubulares alargadas	602	C	-	-	C	-	C	C	C	C	NP	NP	NP
		603	C	-	-	C	-	C	C	C	C	NP	NP	NP
pH	7 ± 0,5	602	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
		603	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Apariencia	Suspensión blanquescina	602	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
		603	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
[Ca ²⁺ libre]	<5 mM	602	C	C	NP	C	C	NP	C	C	C	C	C	C
		603	C	C	NP	C	C	NP	C	C	C	C	C	C
[Proteínas]	1,3 ± 0,2 mg/mL	602	C	C	NP	C	C	NP	C	C	C	C	C	C
		603	C	C	NP	C	C	NP	C	C	C	C	C	C
Preservo	0,07-0,13 mg/mL	602	C	NP	NP	C	C	C	C	C	C	NP	NP	NP
		603	C	NP	NP	C	C	C	C	C	C	NP	NP	NP
Identidad	2 bandas mayoritarias entre 36 y 46 y minoritarias entre 70 y 85 kDa	602	C	C	NP	C	C	C	C	C	C	C	C	C
		603	C	C	NP	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Limite microbiano	<ul style="list-style-type: none"> • <10² bacterias aerobias o hongos por mL • Ausencia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Staphylococcus aureus</i>, <i>Escherichia coli</i> y <i>Salmonella</i> 	602	C	NP	NP	C	NP	NP	C	C	C	NP	NP	NP
		603	C	NP	NP	C	NP	NP	C	C	C	NP	NP	NP
Efectividad del preservo	Crecimiento microbiano < de 2 log a los 14 días No incremento del crecimiento microbiano de los 14 a los 28 días	602	C	C	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C
		603	C	C	-	C	C	-	C	C	C	C	C	C
IgG α PLsuero	Seroconversión (Incremento 3X)	602	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
		603	-	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Legenda: C, Cumple; NC, No cumple; – No realizado; NP, No planificado; m, meses

Tabla 18. Frecuencia de alteraciones histológicas en la región nasal y ganglios regionales en la prueba de dosis única en Ratas Sprague Dawley.

Alteraciones histológicas en el sitio de aplicación	Hembra			Macho			*P
	AFCo1	Placebo	Cont.	AFCo1	Placebo	Cont.	
Congestión vascular	7/10	6/10	8/10	7/10	9/10	9/10	0,57
Edema de la mucosa	7/10	6/10	6/10	5/10	7/10	7/10	0,94
Infiltrado de células inflamatorias redondeadas en la lámina propia	7/10	7/10	6/10	9/10	8/10	9/10	0,92
Focopuradoinfiltrado	6/10	3/10	3/10	1/10	1/10	3/10	0,6
Degeneración focal del epitelio	4/10	4/10	6/10	8/10	10/10	7/10	0,82
Erosión del epitelio	2/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0,56
Foliculos linfoides secundarios en los linfonodos regionales	7/10	4/10	3/10	4/10	3/10	5/10	0,45
Células apoptóticas en los folículos linfoides de ganglios regionales	7/10	3/10	3/10	4/10	3/10	4/10	0,27

Valores para el análisis de log-lineal entre los grupos tratados, Cont: Control

Tabla 19. Cálculo de los índices de irritabilidad nasal en ratas tratadas con una sola dosis (dosis única).

Sex	Tratamiento	Epitelio	Infiltración	Congestión	Edema	I	Ii
Hembras	Control	0,4	2,2	1,0	0,8	4,5	-
	Placebo	0,4	2,9	0,9	0,9	5,0	0,5
	AFCo1	0,8	2,4	1,0	1,0	5,2	0,7
Machos	Control	0,8	2,9	0,8	0,7	5,2	-
	Placebo	1,0	2,9	0,9	0,7	5,5	0,3
	AFCo1	0,9	3,0	0,8	0,5	5,2	0,0

I: Índice absoluto calculado para cada grupo; Ii: Índice relativo de irritabilidad con respecto al grupo control no tratado.

Tabla 20. Hematología y bioquímica sanguínea de las ratas bajo repetida dosificación. Medias e intervalos de confianza para el 95%. Valores de P referidos a la comparación de ANOVA entre los grupos de tratamientos.

Variable	Hembras			Machos			P
	AFCo1	Placebo	Control	AFCo1	Placebo	Control	
Hb g/L	136 (126-146)	139 (129-150)	135 (125-145)	144 (134-154)	134 (124-144)	147 (137-158)	0,64
CRB(10 ⁶ /mm ³)	6,8 (6,2-7,4)	6,1 (5,5-6,7)	6,3 (5,7-6,9)	7,0 (6,4-7,6)	7,2 (6,6-7,8)	6,8 (6,2-7,4)	0,46
TL(10 ⁶ /mm ³)	6,1 (5,0-7,2)	7,1 (6,0-8,2)	7,0 (5,9-8,1)	8,5 (7,4-9,6)	8,2 (7,1-9,3)	7,6 (6,5-8,7)	0,79
Glucosa (mmol/L)	5,2 (4,4-6,0)	5,0 (4,2-5,7)	5,4 (4,7-6,2)	5,9 (5,1-6,6)	5,5 (4,7-6,2)	6,3 (5,5-7,0)	0,22
Creatinina (µmol/L)	47,2 (43-52)	47,8 (43-52)	51,5 (47-56)	42,0 (38-46)	45,4 (41-49)	45,4 (41-49)	0,17
TGO (U/L)	245,3 (221-269)	241,9 (218-265)	182,5 (159-206)	180,5 (157-204)	179,5 (156-203)	193,4 (170-217)	0,066
TGP (U/L)	56,2 (51-61)	51,4 (46-56)	48,1 (43-53)	51,1 (46-56)	55,9 (51-61)	53,2 (48-58)	0,32
FAL(U/L)	256,6 (219-222)	257,7 (221-294)	283,3 (247-320)	372,9 (336-409)	335,1 (298-371)	364,5 (328-401)	0,31
Bilirrubina Total (mg/dL)	4,2 (3,3-5,1)	4,0 (3,2-4,8)	3,4 (2,5-4,2)	3,7 (2,9-4,5)	4,5 (3,7-5,3)	3,6 (2,8-4,4)	0,19
Proteínas Totales (g/dL)	58,7 (56-61)	55,4 (53-57)	56,7 (54-59)	49,7 (47-52)	50,0 (48-52)	51,8 (50-54)	0,17
Uratos (µmol/L)	74,7 (61-89)	78 (63-93)	70,1 (56-84)	52,9 (39-67)	71,0 (57-85)	47,5 (33-62)	0,089
Colesterol (mmol/L)	1,5 (1,4-1,6)	1,5 (1,4-1,6)	1,6 (1,5-1,7)	1,2 (1,1-1,3)	1,3 (1,2-1,4)	1,3 (1,2-1,4)	0,55
Triglicéridos (mmol/L)	0,69 (0,5-0,8)	0,79 (0,6-0,9)	0,73 (0,6-0,9)	0,64 (0,5-0,8)	0,59 (0,4-0,7)	0,55 (0,4-0,7)	0,79
CPK(U/L)	2817 (2488-3145)	2419 (2099-2738)	2363 (2043-2683)	2027 (1707-2347)	2484 (2168-2804)	2492 (2172-2812)	0,98
Urea (mmol/L)	7,4 (7,0-7,9)	6,7 (6,2-7,1)	6,6 (6,2-7,0)	5,4 (5,0-5,9)	5,7 (5,2-6,1)	5,6 (5,2-6,1)	0,39

Prueba de comparación ANOVA entre los grupos tratados en el mismo sexo; Hb: Hemoglobina;

CRB: Células rojas de la sangre; TL: Leucocitos totales; TGO: glutámico-oxalacética; TGP:

transaminasas glutámico-pirúvica; FAL: fosfatasa alcalina; (CPK) creatinfosfoquinasa.

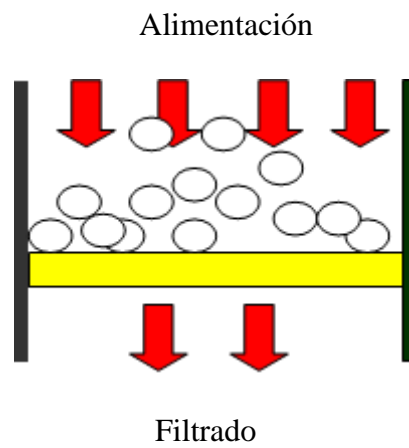
Tabla 21. Ensayo de toxicidad por dosis repetida: Frecuencia de las lesiones en ratones hembras a los 3 y 14 días después de la última dosis.

Lesiones	3 días			14 días			P
	Placebo	Control	AFCo1	Placebo	Control	AFCo1	
Infiltrado inflamatorio en cavidad nasal	0/10	3/10	3/10	2/10	1/10	3/10	0,35
Folículos secundarios en los ganglios regionales del sistema digestivo	3/10	4/10	4/10	5/10	2/10	5/10	0,64
Neumonía intersticial focal	1/10	3/10	0/10	7/10	6/10	2/10	0,041
Focos supurados leves en el hígado	1/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0,77
Focos supurados en parénquima pulmonar	4/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0,067
Degeneración hepática leve	1/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0,78
Focos supurados leves en el pulmón	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5	0,77
Infiltrado perivascular de células mononucleares en el pulmón	0/5	1/5	0/5	1/5	1/5	2/5	0,85

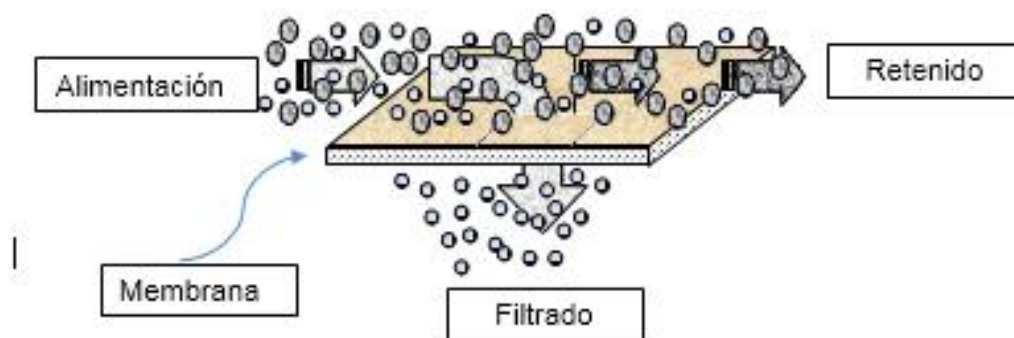
Tabla 22. Cálculo de los índices de irritabilidad nasal en ratas tratadas con cuatro dosis (dosis repetida)

Sexo	Tratamiento	Días	Indicador				Irritación absoluta	Irritación relativa
			Epitelio	Infiltrado	Congestión	Edema		
Hembras	Control	3	0,0	0,3	0,3	0,1	0,7	-
	Placebo	3	0,0	0,0	0,1	0,1	0,2	-0,5
	AFCol	3	0,0	0,4	0,5	0,5	1,4	0,7
	Control	14	0,0	0,4	0,3	0,3	1,0	-
	Placebo	14	0,0	0,3	0,2	0,2	0,7	-0,3
	AFCol	14	0,1	0,4	0,3	0,3	1,1	0,4
Machos	Control	3	0,6	1,3	1,1	1,1	4,1	-
	Placebo	3	0,4	1,0	0,9	0,9	3,2	-0,9
	AFCol	3	0,5	1,1	1,4	1,4	4,3	0,9
	Control	14	0,3	0,9	0,7	0,7	2,6	-
	Placebo	14	0,1	0,6	0,3	0,3	1,3	-1,3
	AFCol	14	0,2	0,3	0,6	0,6	1,7	0,4

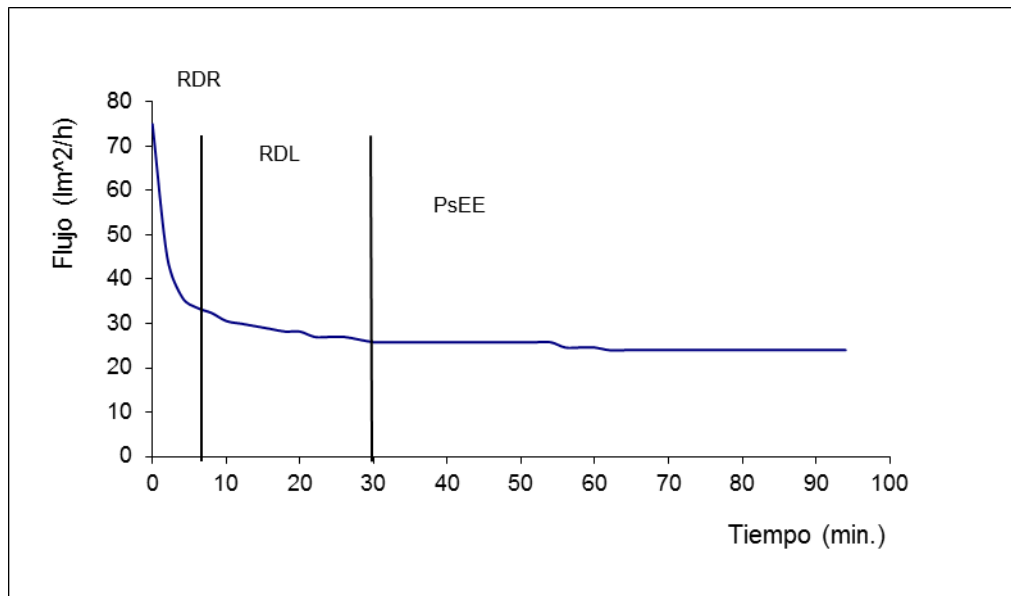
ANEXOS



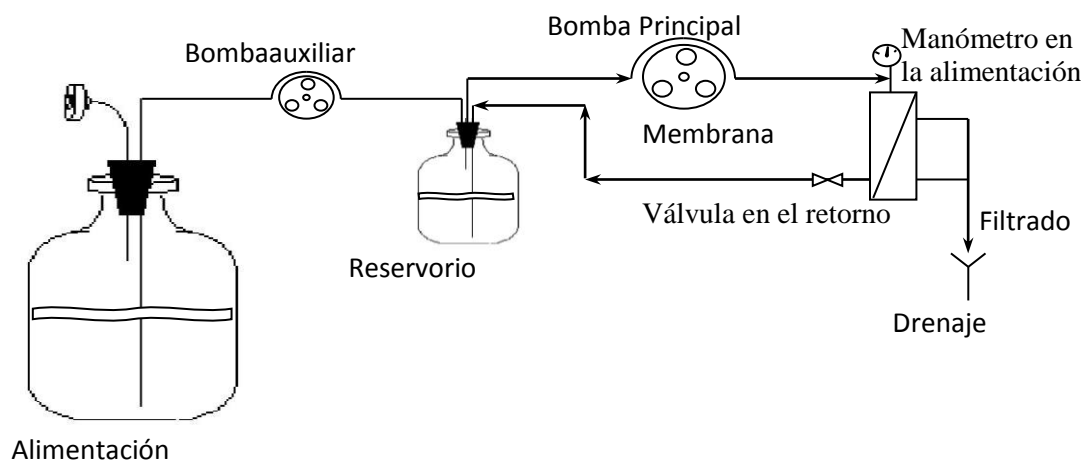
Anexo 1. Representación esquemática de la filtración fondo muerto.



Anexo 2. Esquema representativo del mecanismo de filtración por flujo cruzado.



Anexo 3. Curva de típica de un proceso de filtración donde se observa un rango dinámico rápido (RDR), un rango dinámico lento (RDL) y la caída en un pseudo estado estacionario (PsEE).



Anexo 4. Representación esquemática general del sistema de filtración tangencial (fibra hueca).