

# Principales Sistemas de Entrega de Antígenos en Medicina Veterinaria y Humana

Daniela Siel<sup>1</sup>, Sonia Vidal<sup>1</sup>, Leonardo Sáenz<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Vacunas Veterinarias, Departamento de Ciencias Biológicas Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.

Email: [daniela.r.siel@gmail.com](mailto:daniela.r.siel@gmail.com)

## Resumen

Las vacunas modernas se basan generalmente en proteínas recombinantes altamente purificadas. Esta alta pureza representa uno de los mayores avances en términos de seguridad, en comparación a las estrategias de vacunación tradicionales basadas en patógenos atenuados o inactivados, sin embargo, generalmente se basan en antígenos de baja inmunogenicidad que no inducen una inmunidad protectora suficiente. Esto ha generado la necesidad de utilizar adyuvantes de mayor calidad y potencia asociados a estas formulaciones de vacunación. Los adyuvantes pueden dividirse en dos categorías sencillas, los inmonopotenciados y los sistemas de entrega o liberación de antígenos. En el presente escrito se revisa el estado actual de los principales sistemas de entrega de antígenos: Emulsiones, liposomas, virosomas, ISCOMs y micropartículas. Se consideraron además los mecanismos mediante los cuales ejercen su actividad adyuvante, así como sus características inmunológicas y de formulación.

**Palabras clave:** Adyuvante, antígeno, vacuna, inmunidad.

## 1. Introducción

La vacunación es una forma eficiente y rentable de controlar y potencialmente erradicar enfermedades infecciosas (Bloom y col., 2005; Ehreth J., 2003). Tradicionalmente, patógenos vivos atenuados o patógenos muertos han sido usados como vacunas, pero serios problemas de seguridad, toxicidad y reversión de la virulencia en el caso de los primeros, así como de baja eficacia en la inducción de una respuesta inmune efectiva en el caso de los segundos, han conducido al desarrollo de vacunas de subunidades, compuestas por uno o más antígenos bien caracterizados y altamente purificados. Las vacunas vivas atenuadas proporcionan a las células presentadoras de antígeno (CPAs) el antígeno y los patrones moleculares asociados a

patógenos (PAMPs), que a través de los receptores de patrones (PRR) activan a las CPAs (Coffman y col., 2010). En cambio, antígenos altamente purificados en vacunas de subunidades, generalmente no son suficientes para activar CPAs y por lo tanto inducen una inmunogenicidad débil (Foged y col., 2012). Debido a esto, surgen los adyuvantes, los cuales son compuestos usados en combinación con dichos antígenos purificados, con el objetivo de aumentar la inmunogenicidad y eficacia de la vacuna, sin los efectos adversos que se asocian a las vacunas vivas atenuadas (Foged y col., 2012).

El adyuvante ideal es el que genera una respuesta inmune potente, persistente, de calidad y específica contra un antígeno particular, además debe carecer de toxicidad, ser biodegradable, biocompatible y

químicamente definido para su reproducción (Grupta y Siber, 1995). En este sentido, la elección del adyuvante adecuado es fundamental para el éxito de cualquier vacuna.

Entre los factores involucrados en la selección de un adyuvante se encuentran (I) el tipo de respuesta deseada, (II) la especie vacunada, (III) la ruta de administración y (IV) los efectos colaterales inducidos por el adyuvante (Aguilar y Leal, 2000). Uno de los criterios más importantes para la selección de un adyuvante es su mecanismo de acción, en relación al tipo de respuesta inmune adaptativa que inducen preferentemente, es decir, una respuesta inmune humoral o una respuesta inmune celular, por la estimulación respectivamente de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de tipo T helper 1 (Th1) (mediadores de una respuesta efectora celular) o de tipo T helper 2 (Th2) (mediadores de una respuesta efectora humoral o mediada por anticuerpos) (Kenney y Edelman, 2000).

Actualmente existe información precisa sobre las señales fundamentales para la estimulación de la respuesta inmune adaptativa. La denominada señal 0, corresponde al reconocimiento del antígeno por parte de las CPAs y la consecuente activación de dichas células. La *señal 1* o de presentación antigénica y reconocimiento específico del antígeno, corresponde a la estimulación inicial de células T CD4<sup>+</sup> vírgenes a través del reconocimiento, mediante el receptor de células T (TCR), de un péptido en el contexto de una molécula MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) clase I o II presente en las CPAs. La *señal 2* o de coestimulación, corresponde a la señal proveniente de moléculas co-estimuladoras, como CD40, CD86 y CD80 presentes en las membranas de CPAs y la señal 3 corresponden a las citoquinas producidas por estas células. Dichas señales en conjunto inducen la diferenciación de las células T hacia diferentes subpoblaciones celulares (Guy, 2007). Las formulaciones adyuvantes pueden actuar sobre estas diferentes señales, denominándose así adyuvantes de tipo A los que actúan modulando la señal 0, de tipo B los que actúan sobre la señal 1 y de tipo C los que ejecutan su efecto sobre la señal 2 o 3 (Guy, 2007).

La conexión de la respuesta inmune innata con la inducción de la respuesta inmune adaptativa es la clave en el éxito del diseño de un adyuvante. La activación de las células T CD4<sup>+</sup> vírgenes lleva al desarrollo de

células Th1 o Th2, caracterizadas por su perfil de producción de citoquinas. Mientras las células Th1 son fundamentales para la inmunidad mediada por células y producen principalmente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, el fenotipo Th2 secreta IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 e IL-15, que influyen en la forma, magnitud, calidad e isotipo del anticuerpo producido (Abbas y col., 2008). Además, en el curso de una respuesta inmune, elementos regulatorios son usualmente inducidos, los cuales actúan en desmedro de la fase efectora de la respuesta inmune mediante la producción de citoquinas como TGF- $\beta$  e IL-10. Uno de los más importantes es la diferenciación de células T regulatorias (Tregs) (Coffman y col., 2010; Abbas y col., 2008). En relación a esto, en conjunto, la identificación de formas eficientes de modular las células Th1, Th2 y Tregs, es probablemente, la clave para el desarrollo exitoso de nuevos adyuvantes vacunales (Aguilar y Leal, 2000; Kenney y Edelman, 2000; Levings y col., 2002).

Las sales de aluminio han sido hasta hoy el adyuvante más utilizado en medicina humana y veterinaria. A pesar de que se han logrado buenos resultados con dicha formulación, estas poseen diversas desventajas. En primer lugar, inducen una respuesta preponderantemente de tipo Th2 o humoral y no son capaces de inducir una respuesta inmune celular efectiva, lo que hace que las vacunas basadas en estos adyuvantes sean poco eficientes para el control de patógenos intracelulares e infecciones virales y que además, la respuesta inducida sea muchas veces de corta duración. Por otro lado, las sales de aluminio han mostrado en algunos casos, efectos adversos en su administración subcutánea, como nódulos pruríticos subcutáneos, hipersensibilidad e inflamación granulomatosa severa (Gupta y Siber, 1995; Relyved y col., 1998). Por estas razones, hace años se estudian nuevas formulaciones adyuvantes que permitan generar una respuesta inmune potente, duradera y con baja reactogenicidad. Gran parte de los estudios relacionados con formulaciones adyuvantes, se han centrado en la formulación de *sistemas de liberación o entrega de antígenos* solos o asociados a inmunoestimulantes, que permitan potenciar una respuesta inmune adaptativa potente y específica contra el antígeno objetivo (Reed y col., 2009). Los sistemas de entrega o liberación de antígenos optimizan la presentación de antígenos a las células del sistema inmune innato, mediante la

liberación controlada o el aumento de la dimensión del antígeno. Algunos de los principales representantes de este tipo de formulaciones adyuvantes son: liposomas, virosomas, micropartículas, emulsiones y complejos inmunoestimulantes (ISCOMs) (Reed y col., 2009).

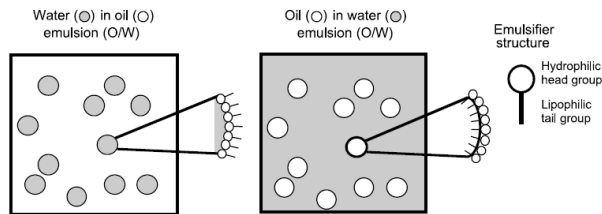
En el presente artículo se revisan las principales características estructurales y los mecanismos más importantes mediante los cuales actúan sistemas de entrega de antígenos, describiéndose los aspectos generales de su utilización en investigación, medicina veterinaria y humana.

## 2. Principales adyuvantes utilizados como sistema de liberación o entrega de antígenos

### 2.1. Emulsiones

#### Características generales

Las emulsiones son dispersiones líquidas con dos fases, generalmente aceite y agua. Una de ellas corresponde a la fase dispersa y otra a la fase continua, generándose así las emulsiones de agua en aceite (w/o) y las de aceite en agua (o/w) (Figura 1) (Jansen y col., 2005).



**Figura 1,** Emulsiones de agua en aceite (W/O) y de aceite en agua (O/W). Se observa las diferencias en la orientación de los lípidos, en las emulsiones W/O las colas lipofílicas se orientan hacia la fase dispersa y en las emulsiones O/W las cabezas hidrofílicas se encuentran orientadas hacia la fase dispersa (Copland y col., 2005).

Las emulsiones tienen una larga historia de uso como adyuvantes en productos destinados a animales y humanos. Aproximadamente 75 años atrás, Jules Freund creó una emulsión con una combinación de aceite mineral combinada con micobacterias, llamado el adyuvante completo de Freund (CFA) (Freund y col., 1937). La emulsión W/O sin la bacteria fue luego conocida como el adyuvante incompleto de Freund

(IFA), que fue usado posteriormente en el desarrollo de muchas vacunas veterinarias (Jansen y col., 2005). Aunque han sido usadas en humanos, particularmente para la vacunación contra influenza, las emulsiones w/o producen demasiadas reacciones adversas como para que su uso sea masivo (Jansen y col., 2005).

Basado en la larga historia de uso de las emulsiones como adyuvantes, incluido el IFA, muchos grupos han investigado el desarrollo de formulaciones de emulsiones mejoradas, que puedan ser aceptadas para su uso en humanos (Ott y col., 2001). Es así como surge la emulsión MF59 que es una emulsión o/w con bajo contenido de aceite. El aceite usado en el MF59 es escualeno, una sustancia encontrada naturalmente en plantas y en el hígado de un amplio rango de especies, incluido el humano. El escualeno es un intermediario en la vía biosintética de las hormonas esteroidales en humanos y es un precursor sintético directo del colesterol, por lo tanto, un aceite biodegradable, biocompatible y producido naturalmente. El 80% del aceite hepático del tiburón es escualeno, por lo que el hígado de tiburón es la fuente natural original de escualeno que se ha usado para preparar MF59. La experiencia con MF59 muestra que las emulsiones o/w pueden ser usadas como adyuvantes efectivos, con un perfil de seguridad aceptable (Ott y col., 2001), además, al ser utilizado con diversos antígenos se ha mostrado capaz de inducir títulos de anticuerpos mayores y con un mejor balance IgG1 (Th1):IgG2a (Th2) que los obtenidos con las sales de aluminio (Ott y col., 1995).

#### Mecanismo de acción

MF59 es un adyuvante de tipo B, ya que estimula la respuesta inmune específica modulando principalmente la señal 2 necesaria para la generación de inmunidad contra el antígeno (Brunner y col., 2010). Los efectos moleculares de MF59 han sido descritos en el modelo ratón luego de su inyección intramuscular, demostrándose que induce el reclutamiento de CPAs y aumento en la expresión de genes asociados al procesamiento y presentación antigénica, además de un aumento en la expresión de citoquinas, quimioquinas y receptores de dichas moléculas (Mosca y col., 2008). MF59 potencia la inmunogenicidad de vacunas contra la influenza en ratones (Cataldo y Van Nest, 1997) y ha mostrado ser ejercer un adyuvante más potente que el aluminio contra el virus de la hepatitis B (HBV) en

babuinos (Traquina y col., 1996) y humanos (Heineman y col., 1999).

MF59 genera un efecto depósito del antígeno, interactúa con las CPAs en el sitio de inyección, dispersándose lentamente a los nódulos linfáticos, donde llega a su máxima concentración dos días después de la inyección. En los linfonodos, es endocitado por las células residentes que poseen características de CPAs (Schultze y col., 2008), promoviendo además la diferenciación de monocitos hacia un fenotipo del tipo célula dendrítica (CD-like) y potencia la captación del antígeno por las CDs (Tritto y col., 2009).

MF59 es un adyuvante que induce una respuesta humoral marcada (respuesta Th2) y una respuesta celular potente (respuesta Th1) que promueve la generación de células T citotóxicas (Valensi y col., 1994; Radosevic y col., 2008). Además, el uso de MF59 induce respuestas inmunes más potentes que las generadas al usar las sales de aluminio como adyuvante (Vajdy y col., 2006; Wack y col., 2008). Por otro lado, ensayos clínicos han demostrado que MF59 es seguro para su uso en humanos, hecho que fue también observado en un estudio clínico en humanos usando la formulación de vacunación H5N1 (Novartis) (Banzhoff y col., 2009).

#### *Usos en medicina humana y veterinaria*

Actualmente, MF59 es utilizado de forma rutinaria como adyuvante en la vacuna contra la influenza Flud® (Novartis) (Li y col., 2008), así como en la vacuna experimental contra el virus de la influenza aviar A/H9N2 (Atmar y col., 2006) y contra el VHB (Heineman y col., 1999). La seguridad e inmunogenicidad del MF59 como adyuvante en la vacuna contra la influenza humana (Flud®, Novartis) fueron confirmadas en sujetos de la tercera edad en ensayos clínicos (De Donato y col., 1999), dichos datos clínicos permitieron la aprobación del licenciamiento de este producto en Europa en el año 1997.

En medicina veterinaria, las emulsiones se encuentran entre los adyuvantes más eficientes conocidos, y son ampliamente usados en vacunas veterinarias; sin embargo, de forma similar a lo observado en humanos, pueden inducir reactividad local y generalizada, como granulomas, abscesos o fiebre (Aucouturier y col., 2001).

Generalmente, las emulsiones W/O (de agua en aceite) son recomendadas para bovinos, pequeños rumiantes, aves y peces, cuando se necesita una inmunidad de larga duración. En el caso de la fiebre aftosa, emulsiones basadas en aceites minerales pueden proteger a los bovinos por un año con una vacunación, mientras que formulaciones basadas en hidróxido de aluminio, requieren dos o más revacunaciones. Incluso si se produce alguna reacción local, las emulsiones W/O pueden ser usadas cuando la protección contra una enfermedad específica es significativamente más eficiente que la lograda con otras formulaciones u otras rutas de administración, lo que justifica algunas reacciones colaterales. Este es el caso de vacunas contra la furunculosis en peces, donde los procedimientos pueden ser limitados a una inyección y la protección se mantiene durante todo el período de crecimiento del pez. Emulsiones W/O también permiten disminuir la dosis de vacunación o la concentración del antígeno utilizada, potenciando respuestas inmunes celulares potentes (Jansen y col., 2006; Heegaard y col., 2011).

Las vacunas contra los virus New Castle y Bronquitis Infecciosa en aves (basadas en Miglio-840, un triglicérido de cadenas medias) no producen reacciones locales, ni residuos vacunales, excepto cuando la emulsión utilizada es del tipo W/O. En contraste, vacunas equivalentes con aceite mineral han mostrado reacciones locales moderadas en el sitio de inyección 12 semanas después de la inoculación (Jansen y col., 2006; Heegaard y col., 2011). De forma similar, se han observado reacciones granulomatosas y abscesos en pollos en el sitio de inoculación 8 a 16 semanas después de la administración de una vacuna con adyuvante oleoso preparado con distintas soluciones de parafina.

Vacunas para animales de compañía y caballos no deben inducir reacciones locales, por lo tanto, se utilizan emulsiones O/W (de aceite en agua) basadas en aceites no minerales, que son menos reactivas (Heegaard y col., 2011).

Por lo tanto, las emulsiones agua en aceite (W/O) inducen inmunidad potente y de larga duración, pero pueden a veces producir reacciones locales con antígenos reactivos. Aceites no minerales son bien tolerados pero menos eficientes con antígenos poco inmunogénicos. Por otro lado, el tipo de antígeno influye en la selección del adyuvante a utilizar. Aceites minerales pueden ser usados cuando el antígeno no

genera reacciones adversas, como proteínas purificadas o péptidos sintéticos. Aceites no minerales se usan preferentemente con antígenos más inmunogénicos (Aucouturier y col., 2001; Heegaard y col., 2011).

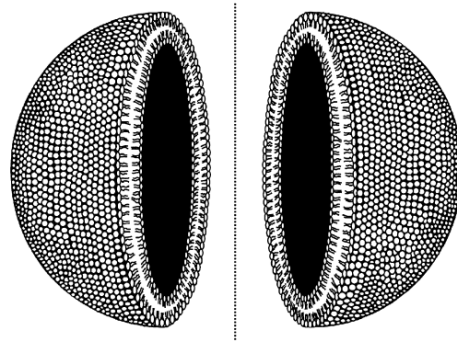
Los adyuvantes deben potenciar una respuesta inmune humoral y/o mediada por células de acuerdo al mecanismo de protección contra la enfermedad para la cual se está vacunando. En relación a esto, emulsiones W/O son capaces de inducir respuestas inmunes celulares en cambio, emulsiones O/W inducen respuestas preferentemente humorales aunque también han sido asociados con respuestas inmunes celulares. (Aucouturier y col., 2001; Heegaard y col., 2011).

Debido a que aún no se logra un equilibrio entre la potencia de la respuesta inmune inducida y el riesgo de reactogenicidad inducida por las emulsiones, diversos grupos de investigadores han desarrollado nuevas emulsiones que permitan resolver esta problemática. Un ejemplo de esto son los Montanides (ISA51 e ISA720) que son emulsiones W/O con características físicas similares al adyuvante incompleto de Freund (IFA) pero se caracterizan por ser biodegradables (Aucouturier y col., 2006; Scalzo y col., 1995). Los Montanides han sido utilizados en ensayos de vacunas contra malaria, VIH y cáncer (Kenney y Edelman, 2003) e inducen una respuesta inmune potente, sin embargo su principal desventaja es la dificultad de su formulación, debido a que la emulsificación resulta costosa. Además, en varios estudios se han observado reacciones locales inaceptables para su uso extensivo (Wu y col., 2008).

## 2.2. Liposomas

### *Características Generales*

Los liposomas son vesículas preparadas artificialmente, de tamaño nanométrico, aunque algunas pueden alcanzar tamaños mayores, y forma relativamente esférica con una fase acuosa interna rodeada por una o más bicapas lipídicas (Figura 2). Alec D. Bangham en 1961 descubrió que los fosfolípidos en agua forman inmediatamente esferas cuyas paredes se encuentran organizadas en bicapas debido a que cada molécula tiene un terminal hidrosoluble en tanto el otro es hidrofóbico, es decir se trata de moléculas anfifílicas (Bangha, 1961; Bangha, 1968).



**Figura 2,** Representación esquemática de una liposoma unilaminar, en el centro en negro se observa la porción acuosa y en el exterior la bicapa lipídica (Copland y col., 2005).

A diferencia de los sistemas miscelares, los liposomas no se forman espontáneamente y se requiere por lo tanto, la adición de energía al sistema para generar la formación de las bicapas lipídicas. En su proceso de formación, los liposomas atrapan moléculas como drogas o antígenos, presentes en el medio acuoso o de forma alternativa, moléculas solubles en lípidos pueden pasar a formar parte de la bicapa lipídica. Además, diversas moléculas como ácidos nucleicos y proteínas pueden ser adsorbidas en la superficie de las membranas liposomales a través de interacciones electrostáticas (Gregoriadis y col., 2014). La estructura de bicapa varía en diámetro, desde 30nm (y por lo tanto estos liposomas son definidos como nanotecnología) a varios micrómetros. Generalmente los liposomas son conocidos como vesículas unilaminares pequeñas (SUVs), vesículas multilaminares (MLVs) y vesículas multilaminares grandes (LUVs) (Gregoriadis y col., 2014).

Por lo tanto, los liposomas son esferas fosfolípicas formadas por capas de lípidos que pueden encapsular antígenos y actuar como sistemas de liberación e inmunopotenciación (Baca-Estrada y col., 1997). Los liposomas pueden ser usados como sistema de entrega para proteínas, antígenos derivados de péptidos y ácidos nucleicos que codifican antígenos (plasmidios de ADN o ARNm) o bloqueen genes objetivos (siARN) (Harpin y col., 1999; Kakuda y col., 2001; Allison y col., 1974). Además, la composición de los liposomas puede ser alterada para que incluya un esterol, como por ejemplo

colesterol, lo que entrega estabilidad y fluidez a la bicapa, cargándose los anfifilos y generándose bicapas cargadas negativa o positivamente. Características físicas de los liposomas como el tamaño de la vesícula, la carga de superficie, la composición lipídica y la fluidez de la bicapa, juegan un rol importante en la determinación del comportamiento de la vesícula en el medio biológico y en la actividad farmacológica de las drogas que esta transporta. La versatilidad estructural de los liposomas, su naturaleza inocua y su capacidad para incorporar una gran cantidad de diferentes moléculas con actividad farmacológica, han contribuido al uso de estos como sistemas de entrega de antígeno y de drogas con fines terapéuticos (Gregoriadis y col., 2014).

#### *Mecanismo de acción*

Son un adyuvante tipo B, es decir estimulan principalmente la señal 2 en el desencadenamiento de la respuesta inmune (Brunner y col., 2010). La capacidad adyuvante de los liposomas depende del número de capas lipídicas (Heath y col., 1976), de su carga eléctrica (Tyrrell y col., 1976), su composición (Van Rooijen y col., 1983) y del método de preparación utilizado (Eldridge y col., 1991; Kramp y col., 1982). Se ha observado en diversos estudios que su uso potencia tanto la inmunidad humoral como la mediada por células contra antígenos protéicos y polisacáridos (Brunner y col., 2010; Kramp y col., 1982).

La ruta del procesamiento intracelular de los liposomas es relevante para el diseño de sistemas de liberación de moléculas a las células tales como: drogas, antígenos, ADN, oligonucleótidos antisentido (*antisense*), etc. *In vitro*, los liposomas convencionales son capaces de liberar proteínas en los compartimentos endosomales-lisosomales. De manera que, para el caso de los antígenos, las vesículas liposomales favorecen el procesamiento de estas moléculas en el interior de las CPAs y la presentación de los péptidos inmunodominantes derivados de ellas, en las moléculas del complejo MHC II (Leserman y col., 1998), induciendo una respuesta inmune preferentemente mediada por anticuerpos. Las ventajas fundamentales de los liposomas como inmunoadyuvantes se resumen en: (i) la capacidad de imitar a patógenos al transportar grandes cantidades de antígenos a las CPAs, (ii) la posibilidad de co-encapsular antígenos junto con moléculas inmunoestimuladoras, (iii) la flexibilidad en

cuanto a la modificación de sus propiedades físico-químicas con el propósito de una mayor efectividad, y (iv) el hecho de ser biodegradables y no tóxicos (Leserman, 2004).

Además, los liposomas son capaces de fusionarse con las membranas celulares de los macrófagos, lo que permite la entrega de proteínas al citoplasma, por lo cual, estas proteínas son procesadas y presentadas por las moléculas MHC-I, activando una respuesta celular citotóxica mediada por linfocitos T CD8+ (Owais y Gupta, 2000; Zheng y col., 1999).

Una característica importante de los liposomas es que pueden ser producidos con distintas propiedades de carga, como vesículas lipídicas catiónicas derivadas del colesterol u opcionalmente fosfolípidos neutros que son capaces de unir el antígeno en su superficie y así estimular la presentación antigénica (Guy y col., 2001). Mediante la optimización de la composición lipídica y las propiedades biofísicas de los liposomas, es posible también direccionar el efecto de la vacuna sobre tejidos o tipos celulares específicos. Varios grupos han reportado que antígenos encapsulados en liposomas catiónicos son fagocitados por las células dendríticas con mucha mayor eficiencia que en el caso de partículas aniónicas, induciendo la activación y mejorando la presentación antigénica al sistema inmune (Foged y col., 2004; Thiele y col., 2001).

Además, los liposomas pueden tener actividad inmunoestimuladora mediante la inclusión de PAMPs en su estructura. Por ejemplo, se ha reportado la activación de CPAs a través de la activación de TLR-4 o CD14 cuando se agregó lipopolisacárido (LPS) a los liposomas (Immordino y col., 2006).

Por otro lado, se ha observado que la adición de un ligando específico de receptores de manosa en los liposomas, genera la entrega del antígeno específicamente a CPAs esplénicas CD11c+ luego de la inmunización parenteral (Hattori y col., 2004). Para activar otros tipos celulares, se han adicionado también inmunoglobulinas o fragmentos Fab a los liposomas. En dicho caso, la unión de los liposomas a las células es el resultado de la afinidad y la avidéz de la unión entre la inmunoglobulina y el marcador en la superficie celular (Maruyama, 2002). Además, los liposomas se han utilizado ampliamente para la entrega oral e intranasal de antígenos en ratones, como por ejemplo para la

administración de subunidad B de la toxina del cólera o IgA (Gerds y col., 2006).

#### *Usos en medicina humana y veterinaria*

La formulación de liposomas catiónicos estables denominada CAF01, ha mostrado actividad prometedora en un modelo animal al ser utilizada en una vacuna de subunidad contra la tuberculosis (TBC) (Lindenstrom y col., 2009) y ha podido ser producida a gran escala. Además, en estudios de fase I ha resultado ser segura. Se ha observado que la vacuna contra TBC basada en CAF01, genera un efecto depósito, generando una liberación lenta del antígeno, activando CPAs (Kamath y col., 2009). Esta formulación estimula respuestas tanto humorales como celulares e induce la generación de linfocitos T de memoria polifuncionales (Lindenstrom y col., 2009).

Diversos grupos de investigadores han desarrollado estrategias de vacunación basadas en liposomas, contra diversas enfermedades, como la leishmaniasis visceral, donde se ha observado en modelo murino, una mayor eficiencia de la vacuna al utilizar liposomas como adyuvantes, en comparación con otras estrategias inmunoestimulantes como son el MPL-A (lípid A monofosforilado) y BCG (Bacilo Calmette-Guerin) (Ravindran y col., 2010).

Existen productos basados en liposomas, aprobados para su uso clínico, estos incluyen productos usados para el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas AmBisome®), para el tratamiento de ciertos cánceres, como el sarcoma de Kaposi (Caelyx/Doxil® y DaunoXome®) y la vacunación contra la hepatitis A (Epaxol-Berna®) y la influenza (Infexal Berna V®). La mayoría de estas aplicaciones se asocian a la capacidad e los liposomas de transportar drogas hacia los macrófagos que es donde residen los patógenos o de evitar tejidos como por ejemplo riñón o corazón, que son sensibles a ciertas drogas (Baca-Estrada y col., 1997).

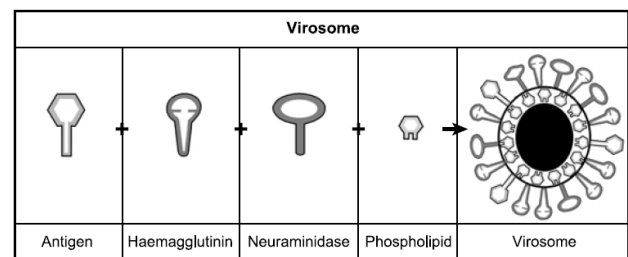
En medicina veterinaria los liposomas no han sido utilizados de forma masiva, algunos de los ejemplos más importantes de su uso en animales incluyen el estudio de liposomas como nuevos sistemas de entrega de terapia contra el cáncer y vacunas para perros y gatos (Marr y col., 2004; Poirier y col., 2002; U'Ren y col., 2007). Tana *et al.* (1997) describió que liposomas catiónicos fueron eficientes en promover la entrega del gen que codifica la cadena A de la toxina diftérica en células

infectadas con el virus de la leucemia bovina luego de la inyección intratumoral (Tana y col., 1997). También han sido evaluadas vacunas de subunidades basadas en proteínas antigénicas encapsuladas en liposomas. La inmunización subcutánea contra el herpes virus bovino tipo 1, con un antígeno viral encapsulado en el liposoma, y la adición de IL-12 en dicha formulación, ha mostrado inducir respuestas inmunes humorales y celulares antígeno específicas (Baca-Estrada y col., 1997). Más recientemente, se ha observado la inducción de una respuesta inmune específica contra *Brucella abortus*, utilizando un antígeno recombinante en liposomas como sistema de entrega en ratones (Mallick y col., 2007). Los liposomas han tenido problemas para ser utilizados de forma extensiva debido a la dificultad de su manufactura, estabilidad y alto costo, lo que ha limitado su uso. El dolor producido en el sitio de la inyección es probablemente la mayor limitación de algunas vacunas basadas en liposomas (Allison y col., 1991; Owais y col., 2000; Ben-Yehuda y col., 2003).

### 2.3. Virosomas

#### *Características generales*

Los virosomas son estructuras unilaminares compuestas por membranas lipídicas y proteínas de membranas virales (Figura 3). Estas partículas vacías son asociadas a antígenos, lo que genera un potenciamiento de la inmunidad contra distintas formulaciones de vacunación (Moser y col., 2011). Es decir, los virosomas son formulaciones liposomales que poseen proteínas de envoltura viral en su membrana lipídica y poseen probada eficacia como adyuvantes (Moser y col., 2003).



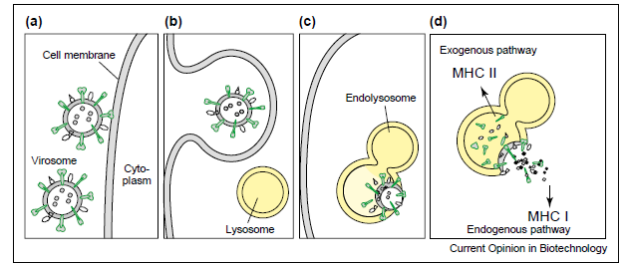
**Figura 3,** Representación esquemática de los componentes de un virosoma tradicional. En este ejemplo se muestran la hemoaglutinina y la neuraminidasa como proteínas de la envoltura viral (Copland y col., 2005).

Los virosomas representan una nueva forma de vacunas que imitan de manera muy exitosa al virus nativo. Son partículas “virus-like” o similares a virus que se generan mediante la reconstitución de la envoltura viral, sin el material genético del virus. Por ejemplo, la reconstrucción funcional de virosomas de influenza, preserva el receptor de unión y la actividad de fusión del virus pero elimina todo su material genético. Como los virosomas carecen del ARN viral, la unión y fusión de los virosomas a las células no resulta en la infección de dichas células (Wilschut y col., 2009).

#### Mecanismo de acción

La tecnología de los virosomas ha sido estudiada en diferentes modelos de vacunas contra una gran variedad de virus, pero se encuentra particularmente avanzada en relación a vacunas contra el virus influenza (Moser y col., 2011; 79. Zurbriggen y col., 2003), aunque los conocimientos obtenidos con dicho modelo han sido rápidamente aplicados a otros virus, como el virus de la estomatitis vesicular (Shoji y col., 2004), el virus de la enfermedad de New Castle (Kapczynski y col., 2003) y el virus Sendai (Kim y col., 2002). Los virosomas derivados de proteínas de la envoltura del virus influenza se denominan IRIVs (Moser y col., 2011; Zurbriggen y col., 2003) y tal como se mencionó antes, son los más estudiados en cuanto a su mecanismo de acción, por lo que han servido como modelo de estudio de los virosomas y su funcionamiento.

En relación a las vías del procesamiento antigénico mediadas por virosomas (Figura 4), primero, el virosoma se une al ácido siálico de las CPAs, luego se produce la endocitosis del virosoma y la fusión del virosoma a la membrana del endolisosoma. Finalmente, se genera el procesamiento y presentación antigénica, mediante la vía de presentación mediada por MHC-I cuando el contenido virosomal es liberado al citoplasma celular, o por medio de la vía de presentación mediada por MHC-II, cuando los antígenos permanecen en el endolisosoma sin pasar al citosol (Felnerova y col., 2004).



**Figura 4.** Vías de presentación antigénica mediadas por virosomas. A: unión del virosoma a la membrana de la CPA. B: endocitosis del virosoma. C: fusión del virosoma al endolisosoma. D: procesamiento y presentación antigénica mediante moléculas MHC-I (vía endógena) o MHC-II (vía exógena) (Felnerova y col., 2007).

Los virosomas son muy eficientes en la inducción de una respuesta inmune frente a antígenos. Son capaces de inducir la maduración de células dendríticas, desencadenando una respuesta inmune humoral y una respuesta inmune mediada por células, además, una de sus características más importantes es que son capaces de potenciar respuestas de tipo citotóxicas mediadas por linfocitos T CD8<sup>+</sup>, respuesta fundamental para el control de enfermedades causadas por agentes infecciosos virales (Wilschut y col., 2009).

#### Usos en medicina veterinaria y humana

En general, hasta hoy los virosomas han sido usados en medicina veterinaria y humana preferentemente con fines investigativos. Los virosomas han sido utilizados hace unos años en ensayos clínicos y preclínicos asociadas a diferentes enfermedades asociadas a medicina humana y veterinaria, como es el caso del tétano, difteria y la malaria (Zurbriggen y col., 1999). Además, una vacuna contra influenza basada en virosomas (Inflexal V®) ha sido aprobada y comercializada por ya varios años (Bovier y col., 2008). También se ha demostrado que el virus de la hepatitis A (HAV) adsorbido en la superficie de virosomas (Epaxal®, producido por Crucell), es capaz de inducir una respuesta inmune tan efectiva como la inducida por la vacuna tradicional contra la hepatitis A, pero con menos efectos secundarios (Bovier y col., 2008).

Si bien, se requieren más estudios asociados al uso de virosomas tanto en humanos como en diferentes especies animales, para que su uso se extienda, los virosomas se vislumbran como el sistema ideal de

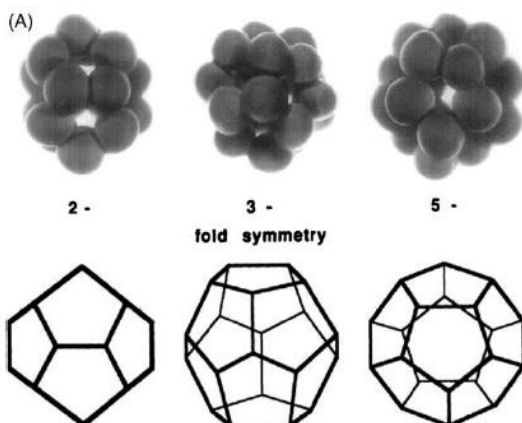


entrega o liberación de antígenos al citosol de las CPAs, induciendo así la presentación antigénica mediada por moléculas MHC-I, direccionando por lo tanto, la respuesta inmune adaptativa principalmente hacia una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Wilschut y col., Daemen y col., 2005).

#### 2.4. Complejos inmunoestimulantes (ISCOMs)

##### Características generales

Los ISCOMs son complejos esféricos miscelares de alrededor de 40nm (Figura 5). Son generados mediante una mezcla de una saponina (molécula aislada desde el tronco del árbol *Quillaja saponaria*), fosfolípidos y colesterol (Dalsgaard y col., 1978). Las saponinas preferidas a ser usadas para la formulación de ISCOMs son Quil A o QS21 y el esterol utilizado es preferentemente colesterol y el fosfolípido usado es generalmente fosfatitiletanolamina (Dalsgaard y col., 1978; Rimmelzwaan y col., 1997). La saponina Quil A es además un adyuvante potente que ha sido usado en vacunas veterinarias desde los años 70 (Dalsgaard y col., 1978).



**Figura 5,** Primer modelo de ISCOMs desarrollado por Ozel y col. (1989).

Por otro lado, el adyuvante ISCOMATRIX, es un derivado del ISCOM generado para mejorar las respuestas obtenidas por los ISCOMs. Las vacunas basadas en ISCOMATRIX poseen solo una porción purificada de saponina y han mostrado ser seguras, bien toleradas y altamente inmunogénicas en humanos,

generando respuestas inmunes de anticuerpos y células T (Drane y col., 2007). En vacuna de ISCOM el antígeno vacunal es incorporado durante la formación del adyuvante ISCOM, mientras que una vacuna basada en ISCOMATRIX es formada mezclando el antígeno con un adyuvante ISCOMATRIX preformado. Aparte de eso, ambas formulaciones adyuvantes son idénticas.

##### Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de las saponinas como adyuvantes se basa en su alta afinidad por el colesterol y al unirse a éste en la superficie celular, inducen la formación de poros en las membranas celulares (Dalsgaard y col., 1978; Rimmelzwaan y col., 1997). La principal ventaja de los ISCOMs como estrategia, es que permiten disminuir la dosis de saponinas en la formulación, que son altamente tóxicas al ser usadas por si solas como formulación adyuvante (Takahashi y col., 1990; Cox y col., 1998; Bovier y col., 2008).

Los ISCOMs son capaces de inducir la activación de CPAs (Behboudi y col., 1996), aumento de la expresión de moléculas MHC-II en CPAs (Bergstrom-Mollaoglu y col., 1992), inducción de secreción de citoquinas como IL-2 e IFN- $\gamma$  (Dotsika y col., 1997), respuestas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (Maloy y col., 1995) y respuestas de linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (Takahashi y col., 1990).

Ha sido descrito que los ISCOMs inducen una respuesta inmune protectora en una gran variedad de modelos experimentales y generan respuestas citotóxicas contra algunos antígenos como la glicoproteína del virus VIH y una hemoaglutinina del virus influenza (Dalsgaard y col., 1978; Rimmelzwaan y col., 1997).

Los ISCOMs son un sistema versátil y flexible. Además de las saponinas de colesterol, existen otros inmunomoduladores, dirigidos a distintos antígenos, que pueden ser agregados a los ISCOMs. El lipopolisacárido (LPS) bacteriano o el monolípido A es incorporado fácilmente en el ISCOM. En términos farmacéuticos, el ISCOM es un sistema de liberación que combina el antígeno con el adyuvante y activadores de CPAs, para el transporte y distribución de antígenos tanto para la vía citosólica como para la endosomal. Los componentes de los ISCOMs inducen fácilmente una respuesta inmune adquirida, ya que activan CPAs y linfocitos T (Hu y col., 2001). Un punto interesante a considerar es que las vacunas basadas en ISCOMs

facilitan la presentación cruzada en células dendríticas por traslocación del antígeno desde los endosomas al citosol (Schnurr y col., 2005; Schnurr y col., 2009), lo que induce la presentación del antígeno vía MHC-I y por lo tanto, el desarrollo de una respuesta citotóxica, mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

#### *Usos en medicina veterinaria y humana*

En diversas investigaciones se ha demostrado la capacidad adyuvante de los ISCOMs. La aplicabilidad de los ISCOMs es diversa, además de ser administrados por vía parenteral, han sido usados para la entrega mucosal de antígenos (Mowat y col., 1991).

Los ISCOMs han sido utilizados principalmente en ensayos pre-clínicos y en algunos ensayos clínicos, como formulaciones de vacunación contra influenza, hepatitis B, malaria y cáncer, entre otras enfermedades (Reed y col., 2009). En diversos estudios, se ha observado que las vacunas contra tumores que poseen ISCOM e ISCOMATRIX como formulación adyuvante, poseen la capacidad de inducir una respuesta inmune celular y humoral de larga duración contra los antígenos tumorales en modelo ratón (Maraskovsky y col., 2004; Jacobs y col., 2011), así como en pacientes humanos con cáncer (Davis y col., 2004). En conjunto, estos estudios han demostrado el alto potencial clínico de estas formulaciones como adyuvantes eficaces en vacunas contra tumores.

En medicina veterinaria, la primera vacuna comercial basada en ISCOMs fue diseñada para caballos, y contiene las proteínas Hemoaglutinina y Neuraminidasa, provenientes de la envoltura del virus influenza. Dicha vacuna, ha sido licenciada e induce una respuesta inmune de larga duración (alrededor de 15 meses), incluyendo una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Recientemente, se ha registrado en Australia y Nueva Zelanda una vacuna anticonceptiva para caballos, basada en ISCOMATRIX (Moreina y col., 2004). En rumiantes, los ISCOMs se han utilizado de forma experimental en formulaciones contra el virus herpes bovino tipo 1 (BHV-1) que causa la bronquitis infecciosa en bovinos (Trudel y col., 1988) y contra el virus de la diarrea viral bovina (DVB) donde la vacuna basada en ISCOMs evitó la infección experimental en ovejas (Carlsson y col., 1991). Además, en pequeños animales (gatos y perros) vacunas basadas en estos complejos han sido exitosas de forma

experimental en la generación de una respuesta inmune adaptativa potente (Osterhaus y col., 1989; Visser y col., 1992).

Si bien los ISCOMs e ISCOMATRIX muestran una actividad adyuvante potente, poseen también limitaciones. Algunos de los problemas asociados a los ISCOMs son su costo, dificultad de manufactura, baja estabilidad y además se ha observado toxicidad y la aparición de reacciones adversas asociadas a su utilización (Ronnberg y col., 1995; Claassen y col., 1992).

## **2.5. Micropartículas de biopolímeros**

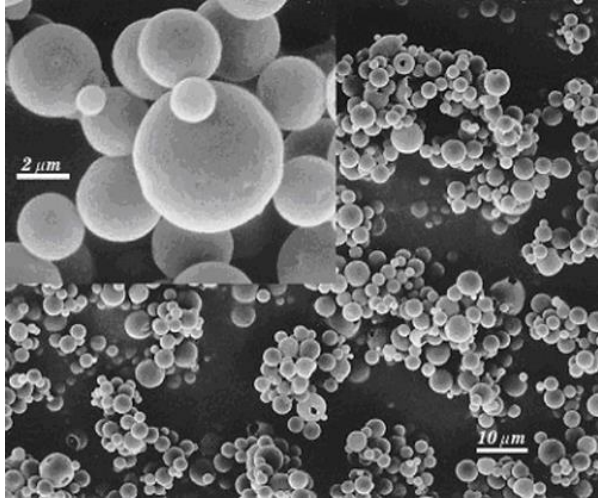
### *Características generales*

El uso de micropartículas poliméricas biodegradables para la presentación de antígenos se reportó inicialmente en los años setenta (Kreuter y col., 1976) y han surgido como una alternativa a los adyuvantes basados en sales de aluminio, que son hasta el día de hoy, los más utilizados en medicina humana

El desarrollo de nuevos derivados poliméricos biodegradables y biocompatibles y nuevas metodologías para la elaboración de estos sistemas, junto con numerosas técnicas analíticas, ha permitido que un gran número de grupos de investigación hayan enfocado sus trabajos en esta disciplina, específicamente en la microencapsulación de proteínas y péptidos sintéticos como antígenos (Alonso y col., 1994; Igartua y col., 1998; Newman y col., 2004). La versatilidad de las partículas poliméricas para el diseño de vacunas mucosales surge debido a la existencia de diferentes polímeros y métodos para la síntesis de partículas, que genera distintos tipos de micro y nanopartículas. La composición de partículas puede basarse en polímeros sintéticos (por ejemplo, poliésteres, polianhídridos, poliaminoácidos), en polímeros naturales (quitosano, arginato, albúmina), copolímeros y en combinaciones de polímeros (Des Rieux y col., 2006).

Entre los biopolímeros utilizados en el desarrollo de sistemas de micropartículas para la liberación controlada de antígenos, destacan los poliésteres alifáticos, formados por unidades monoméricas de ácido láctico y de ácido glicólico (PLGA) (Figura 6). Estos biopolímeros están disponibles comercialmente para uso médico y han sido aprobados por la FDA (Food and Drug Administration) para elaborar sistemas para la

administración de sustancias activas por vía parenteral (Chien-Hua y col., 1998).



**Figura 6.** Micropartículas de ácido láctico co-glicólico (PGLA). Fotografía obtenida mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Magitud 1000X. (Little y col., 2004).

#### *Mecanismo de acción*

Al igual que los adyuvantes descritos anteriormente, son adyuvantes de tipo B, es decir actúan sobre la señal 2 en la inducción de la respuesta inmune (Brunnerv y col., 2010). El efecto inmunoestimulante de las micropartículas se debería principalmente a que se produce fagocitosis de una fracción de las micropartículas, la fracción fagocitada es transportada a los nódulos linfáticos y procesada por las CPAs para que finalmente se produzca la presentación del antígeno a los linfocitos T. Este hecho se ve apoyado en los hallazgos realizados por distintos grupos de investigación, donde micropartículas de menor tamaño han resultado ser más inmunogénicas que las de mayor tamaño (Eldridge y col., 1991; O'Hagan y col., 1993). Además, se ha observado que la utilización de micropartículas es capaz de inducir respuestas mucosales eficaces, con un aumento de la secreción de IgA luego de la vacunación, además de una potente respuesta inmune mediada por células (Florindo y col., 2009). Las micropartículas han mostrado ser capaces de generar un efecto depósito del antígeno que ayuda a la persistencia del antígeno en el sitio de inoculación, lo

que es importante para la inducción de respuestas protectoras mediadas por células T (Storni y col., 2005).

De forma similar a otros sistemas de entrega de antígenos, las partículas de polímeros biodegradables como PGLA, entregan las siguientes ventajas al ser usadas en una formulación para vacunación: (I) Inducen la liberación prolongada del antígeno, (II) protegen al antígeno encapsulado de la degradación enzimática, (III) permiten una entrega dirigida del antígeno, mediante la unión de ligandos y (IV) poseen efectos adyuvantes (Zolnik y col., 2010). Una de las estrategias de diseño para aumentar la funcionalidad de las partículas es variar sus propiedades físico-químicas y su tamaño. Por ejemplo, se ha demostrado que partículas pequeñas (~25nm), llegan más rápido a los linfonodos que las partículas de mayor tamaño (~100nm) y se acumulan en las células dendríticas residentes en los nódulos linfáticos (Reddy y col., 2007). Además, del tamaño, otras propiedades físico-químicas, como la carga de las partículas, pueden ser modificadas, para obtener beneficios terapéuticos, siendo más efectivas las partículas cargadas positiva o negativamente (Zolnik y col., 2010).

Además de las micropartículas, el estudio de partículas más pequeñas, denominadas nanopartículas (<10μm de diámetro) ha ido en aumento en los últimos años. Las nanopartículas son estructuras de tamaño nanométrico formadas a partir de diversos materiales capaces de asociar una molécula bioactiva. Una importante característica de estos sistemas es su mayor capacidad de captación por las células comparado con estructuras de mayor tamaño. Son especialmente interesantes aquellos nanosistemas cuya composición se basa en biomateriales o biopolímeros. La elaboración de nanopartículas a partir de este tipo de materiales garantiza el que se pueda llegar a desarrollar un vehículo biodegradable, biocompatible y potencialmente seguro para su administración en humanos. Las nanopartículas poliméricas diseñadas para la liberación de vacunas pueden actuar mediante un mecanismo de depósito, según el cual el antígeno asociado se va liberando gradualmente de manera sostenida. Además, este tipo de sistemas ofrecen grandes ventajas para la liberación de vacunas a través de las barreras mucosas, especialmente por la vía oral y nasal, siendo capaces de dar lugar a una

respuesta inmunológica sistémica, pero al mismo tiempo a nivel de la mucosa, debido a la importante presencia del sistema inmune en los tejidos asociados a las mucosas (MALT) (Orive y col., 2004; y col., 2008 ).

*Usos en medicina veterinaria y humana*

La liberación de antígenos a partir de microesferas elaboradas con polímeros biodegradables y su relevancia en la respuesta inmunitaria inducida ha sido ampliamente investigada. La gran mayoría de los estudios se han realizado empleando antígenos convencionales tales como el toxoide tetánico (TT) (Gupta y col., 1993; Alonso y col., 1994; Men y col., 1995 ) y el toxoide diftérico (TD) (Singh y col., 1991), pero también algunos grupos de investigación han utilizado antígenos sintéticos (Men y col., 1994; Rosas y col., 2002). Estas investigaciones han confirmado el potencial inmunoestimulante de estos sistemas de micropartículas.

De forma similar a lo obtenido en investigaciones asociadas a medicina humana, en medicina veterinaria, de forma experimental, micropartículas y nanopartículas han mostrado ser eficientes en la inducción de una respuesta inmune humoral y celular en diferentes especies animales (Liebler-Tenorio y col., 2006; Niborski y col., 2006).

**3. Discusión**

La vacunación es una herramienta clave para la prevención y tratamiento de diversas enfermedades. Para mejorar la relación entre seguridad y eficacia de las vacunas, los adyuvantes cumplen un rol fundamental (Perrie y col., 2008). Desde hace años, los adyuvantes más utilizados han sido los derivados de sales de aluminio, sin embargo, debido a su incapacidad de inducir respuestas inmunes celulares efectivas, se han desarrollado diversas estrategias innovadoras para resolver dicha problemática, siendo los sistemas de entrega o liberación de antígenos algunas de las formulaciones más prometedoras.

Tanto los atributos físicos como los efectos celulares inducidos por los componentes de los sistemas de entrega de antígenos, son fundamentales en la inducción de respuestas inmunes dirigidas específicamente contra el antígeno usado y la comprensión de las interacciones que ocurren en el organismo del individuo vacunado, son igualmente importantes en el diseño de estas estrategias adyuvantes (Perrie y col., 2008).

Existen diversos factores a considerar al momento de elegir el adyuvante a utilizar en una vacuna, algunos de los más importantes son: el antígeno a utilizar, la especie a vacunar, el mecanismo de acción de la formulación adyuvante, el tipo de respuesta inmune inducida y la generación de efectos secundarios o reacciones adversas debido a su utilización (Atmar y col., 2006; Vajdy y col., 2006; Schultze y col., 2008; Wack y col., 2008). En la tabla I se resumen las características más importantes de los principales sistemas de entrega de antígenos.

**Tabla 1.** Perfil de respuesta inmune adaptativa, principal mecanismo de acción y generación de reacciones adversas inducidas por los diferentes sistemas de entrega de antígenos. Th1: respuesta inmune celular; Th2: respuesta inmune humoral; CTL: respuesta inmune citotóxica.

FORMULACIÓN ADYUVANTE	Principal mecanismo de acción	Tipo de respuesta inmune inducida	Reacciones secundarias adversas
Emulsiones	- Efecto depósito	Th1/ Th2	Moderada-alta

	- Estímulo de la presentación antigénica		
<b>Liposomas</b>	- Estímulo de la presentación antigénica - Presentación cruzada del antígeno	Th1/Th2/CTL	Moderada
<b>Virosomas</b>	- Estímulo de la presentación antigénica - Inducción de maduración de células dendríticas	Th1/Th2/CTL	Baja
<b>ISCOMs e ISCOMATRIX</b>	- Estímulo de la presentación antigénica - Presentación cruzada del antígeno	Th1/Th2/CTL	Moderada-alta
<b>Micropartículas</b>	- Efecto depósito - Estímulo de la presentación antigénica - Estímulo de inmunidad mucosal	Th1/Th2	Moderada

Según lo expuesto en la presente revisión, si bien existen diferentes formulaciones adyuvantes eficientes en la entrega del antígeno al sistema inmune y en la activación de la respuesta inmune innata, para la generación posterior de inmunidad adaptativa protectora, no existe aún la formulación que muestre un equilibrio absoluto entre la inducción de una respuesta inmune adaptativa efectiva, baja producción de reacciones adversas, simpleza en su formulación y bajo costo. Es por esto, que es necesario el estudio y desarrollo de nuevas formulaciones adyuvantes capaces de inducir respuestas inmunes celulares y humorales en humanos y animales. Idealmente, estas nuevas formulaciones adyuvantes deben ser capaces de generar respuestas inmunes protectoras con un bajo número de administraciones y una pequeña dosis del antígeno (Atmar y col., 2006). Por lo tanto, quedan aún numerosos desafíos para los grupos de investigadores asociados a las ciencias biomédicas, humanas y veterinarias, en relación a este tema.

Probablemente, la respuesta a esta problemática no se encuentra en el uso de una formulación adyuvante por sí sola, sino que en la combinación de dos o más formulaciones adyuvantes. Es así, como hoy diversos grupos de investigadores se encuentran realizando estudios en relación a la utilización de inmunoestimulantes administrados en conjunto con sistemas de entrega de antígenos en una misma vacuna, por ejemplo, emulsiones asociadas a agonistas de TLRs (Coler y col., 2011) o liposomas asociados a LPS (Immordino y col., 2006).

#### **4. Conclusiones**

Las sales de aluminio son hasta el día de hoy el adyuvante más utilizado en medicina veterinaria y humana, si bien se han obtenido buenos resultados usando esta formulación, estas sales generan una potente inmunidad efectora de tipo principalmente humoral, sin embargo, son ineficientes en la inducción de una respuesta inmune celular efectiva y han presentado efectos adversos en algunos casos, lo que ha generado la necesidad de estudiar nuevas estrategias adyuvantes que permitan resolver dichas problemáticas. Los adyuvantes pueden dividirse, en términos generales, en inmunopotenciadores y sistemas de entrega de

antígenos, siendo estos últimos objetos de estudio de diversos grupos de investigación desde hace ya varios años. Algunos de los sistemas de entrega de antígenos más importantes son: Emulsiones, ISCOMs, liposomas, virosomas y micropartículas de biopolímeros. Dichas estrategias presentan diversas ventajas y desventajas, asociadas principalmente a su naturaleza y mecanismos de acción.

Si bien se han logrado grandes avances en el desarrollo y perfeccionamiento de las distintas estrategias de entrega de antígenos, salvo algunas excepciones, no se ha logrado obtener una formulación que permita reemplazar de manera exitosa a las sales de aluminio como adyuvante de uso masivo, lo que ha generado la necesidad de que distintos grupos de investigación continúen trabajando en el desarrollo de estrategias adyuvantes con el fin de obtener un equilibrio entre seguridad e inmunidad efectiva, que generen una mejor respuesta tanto a vacunas funcionales como contra distintos patógenos. Probablemente, en el futuro, los esfuerzos deben ir dirigidos más que a la utilización de una formulación por sí sola, al estudio de la combinación de dos o más estrategias adyuvantes utilizadas de forma simultánea, como por ejemplo, el uso de uno o más inmunopotenciadores en conjunto con un sistema de entrega de antígenos.

#### **5. Referencias**

1. Abbas A, Lichtman A, Pillai S. *Inmunología Celular y molecular*. 6° Ed. Geo Consultoría Editorial. Barcelona, España. 566p. 2008.
2. Allison AG, Gregoriadis G. Liposomes as immunological adjuvants. *Nature* 1974; 252:252.
3. Allison, AC, Byars NE. Immunological adjuvants: desirable properties and side-effects. *Mol Immunol* 1991; 28:27-284.
4. Alonso MJ, Gupta RK, Min C, Siber GR, Langer R. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* 1994; 12: 299-306.
5. Aucouturier J, Dupuis L, Ganne V. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines. *Vaccine* 2001; 19:2666-2672.
6. Aucouturier J, Ascarateil S, Dupuis L. The use of oil adjuvants in therapeutic vaccines. *Vaccine* 2006; 24, 44-45
7. Aguilar J, Leal M. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. *Biología Aplicada* 2000; 17:147-160.
8. Atmar R.L, Keitel WA, Patel S.M, Katz JM, She D, Sahly H. Safety and immunogenicity of nonadjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/H9N2 vaccine preparations. *Clin Infect Dis* 2006; 43:1135-1142.
9. Baca-Estrada ME, Foldvari M, Snider M, van Drunen Littel-van, den Hurk S, Babiuk L.A. Effect of IL4 and IL-12 liposomal formulations on the induction of immune response to bovine herpesvirus type-1 glycoprotein D. *Vaccine* 1997; 15:1753-1760.
10. Baca-Estrada ME, Foldvari M, Snider M, van Drunen Littel-van den Hurk
11. Bangham A. A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. *Nature* 1961; 23:1197-1198.
12. Bangham A. Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol* 1968; 18:29-95.
13. Banzhoff A, Gasparini R, Laghi-Pasini F, Staniscia T, Durando P, Montomoli E. MF59-adjuvanted H5N1 vaccine induces immunologic memory and heterotypic antibody responses in non-elderly and elderly adults. *Plos One* 2009. doi:10.1371/journal.pone.0004384.
14. Behboudi S, Morein B, Villacres-Eriksson M. In vitro activation of antigen-presenting cells (APC) by defined composition of Quillaja saponaria Molina triterpenoids. *Clin Exp Immunol* 1996;105:26-30.
15. Ben-Yehuda A, Joseph A, Zeira E, Even-Chen S, Louria-Hayon I, Babai I. Immunogenicity and safety of a novel liposomal influenza subunit vaccine (INFLUSOME-VAC) in young adults. *J Med Virol* 2003; 69:560-56
16. Bergstrom-Mollaoglu M, Lovgren K, Akerblom L. Antigen-specific increases in the number of splenocytes expressing MHC class II molecules following restimulation with antigen in various physical forms. *Scand J Immunol* 1992; 36:565-74.
17. Bloom DE, Canning D, Weston M. The value of vaccination. *World Econ* 2005; 6:15-39.
18. Bovier, PA. Epaxal: a virosomal vaccine to prevent hepatitis A infection. *Expert Rev. Vaccines* 2008; 7:1141-1150.
19. Brunner R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvant. A brief overview. *Immunology Letters* 2010; 128:29-35.
20. Brunnerv R, Jensen-Jarolim E, Pali-Schöll I. The ABC of clinical and experimental adjuvant. A brief overview. *Immunology Letters* 2010; 128:29-35.
21. Carlsson U, Alenius S, Sundquist B. Protective effect of an ISCOM bovine virus diarrhoea virus (BVDV) vaccine against an experimental BVDV infection in vaccinated and non-vaccinated pregnant ewes, *Vaccine* 1991; 9:577-580.
22. Cataldo DM, Van Nest G. The adjuvant MF59 increases the immunogenicity and protective efficacy of subunit influenza vaccine in mice. *Vaccine* 1997; 15: 1710-1715.
23. Claassen I, Osterhaus A. The iscom structure as an immune-enhancing moiety:experience with viral systems. *Res Immunol* 1992;143:531-541.
24. Coffman R.L, Sher A, Seder R.A. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity* 2010; 33:492-503.
25. Coler RN, Bertholet S, Moutafsti M, Guderian JA, Windish HP, Baldwin SL, Laughlin EM, Duthie MS, Fox CB, Carter D. Development and characterization of synthetic glucopyranosyl lipid adjuvant system as a vaccine adjuvant. *PLoS ONE* 2011; 6:e16333.
26. Copland MJ, Rades T, Davies NM, Baird MA Lipid based particulate formulations for the delivery of antigen. *Immunology and Cell Biology* 2005; 83:97-105.
27. Chien-Hua N, Yuan-Yuan C. FDA perspective on peptide formulation and stability issues. *J Pharm Sci* 1998; 87:133.
28. Cox JC, Sjolander A, Barr IG. ISCOMs and other saponin based adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;32:247-271.
29. Daemen T, de Mare A, Bungener L, de Jonge J, Huckriede A, Wilschut J. Virosomes for antigen and DNA delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005; 57:451-463.

30. Dalsgaard K. A study of the isolation and characterisation of the saponin Quil A. *Acta Vet Scand Suppl* 1978; 69:1-40.
31. Davis ID, Chen W, Jackson H, Parente , Shackleton M, Hopkins W, Chen Q, Dimopoulos N, Luke T, Murphy R. Recombinant NYESO-1 protein with ISCOMATRIX adjuvant induces broad integrated antibody and CD4+ and CD8+ T cell responses in humans. *Proc. Natl.Acad.Sci USA* 2004; 101:10697-10702.
32. Des Rieux A, Fievez V, GarinotM, Schneider YJ, Preat V. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: a mechanistic approach. *J Control Release* 2006; 116:1–27.
33. Dotsika E, Karagouni E, Sundquist B, Morein B, Morgan A, Villacres-Eriksson M. Influence of Quillaja saponaria triterpenoid content on the immunomodulatory capacity of Epstein-Barr virus ISCOMs. *Scand J Immunol* 1997; 45:261-8.
34. Drane D, Gittleson C, Boyle J, Maraskovsky. ISCOMATRIX adjuvant for prophylactic and therapeutic vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 2007; 6:761-772.
35. Ehreth J. The value of vaccination: a global perspective. *Vaccine* 2003; 21:4105– 4117.
36. Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable and biocompatible poly (DL-lactide-co-glicolide) microspheres as an adjuvant for Staphylococcal enterotoxin B toxoid which enhances the level of toxin-neutralizing antibodies. *Infect Immun* 1991; 59: 2978-2986.
37. Eldridge JH, Staas JK, Meulbroek JA, McGhee JR, Tice TR, Gilley RM. Biodegradable microspheres as a vaccine delivery system. *Mol Immunol* 1991; 28:287-294.
38. Felnerova D, ois Viret JF, Gluck R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. *Current Opinion in Biotechnology* 2004; 15:518-529.
39. Freund J., Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of turbecele bacili and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937; 37: 509-513.
40. Foged C, Arigita C, Sundblad A, Jiskoot W, Storm G, Frokjaer S. Interaction of dendritic cells with antigen-containing liposomes: effect of bilayer composition. *Vaccine* 2004; 22:1903-1913.
41. Florindo HF, Pandit S, Gonçalves LMD, Alpar HO, Almeida AJ. New approach on the development of a mucosal vaccine against strangles: systemic and mucosal immune responses in a mouse model. Florindo HF, Pandit S, Gonçalves LMD, lpar HO, Almeida AJ. *Vaccine* 2009; 27:1230-1241
42. Foged C, Hansen J, Agger EM. License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8+ CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 2012; 45:482-491.
43. Gerdts V, Mutwiri GK, Tikoo SK, Babiuk LA. Mucosal delivery of vaccines in domestic animals. *Vet Res* 2006; 37:487-510.
44. Gregoriadis, G, Yvonne P. Liposomes. *Encyclopedia of Life Sciences (ELS)*. doi: 10.1002/9780470015902.a0002656.pub2
45. Gupta RK, Siber GR, Alonso MJ, Langer R. Development of a single-dose tetanus toxoid based on control release from biodegradable and biocompatible polyester microspheres. *Vaccine* 1993; 391-396.
46. Gupta RK, Siber GR. Adjuvants for human vaccines-current status, problems and future prospects. *Vaccine* 1995; 13:1263–1276.
47. Guy B, Pascal N, Francon A, Bonnin A, Gimenez S, Lafay-Vialon E, Trannoy E, Haensler J. Design, characterization and preclinical efficacy of a cationic lipid adjuvant for influenza split vaccine. *Vaccine* 2001; 19:1794-1805.
48. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature reviews* 2007; 5:505-517.
49. Harpin S, Hurley DJ, Mbikay M, Talbot B, Elazhary Y. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhea virus major glycoprotein E2. *J Gen Virol* 1999; 80:3137-3144.
50. Hattori Y, Kawakami S, Suzuki S, Yamashita F, Hashida M. Enhancement of immune responses by DNA vaccination through targeted gene delivery using mannosylated cationic liposome formulations following intravenous administration in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 317:992-999.
51. Heath TD, Edwards DC, Ryman BE. The adjuvant properties of liposomes. *Biochem Soc Trans* 1976; 4:129–133.
52. Heegaard P, Dedieu L, Johnson N, Le Potier M, Mockey M, Mutinelli F, Vahlenkamp T, Vascellari M, Sorensen N. *Arch Virol* 2011; 156:183-202.
53. Heineman TC, Clements-Mann ML, Poland GA et al. A randomized, controlled study in adults of the immunogenicity of a novel hepatitis B vaccine containing MF59 adjuvant. *Vaccine* 1999; 17: 2769–78.
54. Hu k, Chen M, Abusugra I, Monaco F, Morein B. Diffe rent respiratory syncytial virus and Quillaja saponin formulations induce murine peritoneal cells to express different proinflammatory cytokine



- profiles. *Immunol Med Microbiol* 2001; 31:105-112.
55. Hu KF, Lovgren-Bengtsson K, Morein B. Immunostimulating complexes (ISCOMs) for nasal vaccination, *Adv. Drug Deliv. Rev* 2001; 51 149-159.
56. Igartua M, Hernández RM, Esquisabel A, Gascón AR, Calvo MB, Pedraz JL. Enhanced immune response after subcutaneous and oral immunization with biodegradable PLGA microspheres. *J Control Release* 1998; 56: 63-73.
57. Immordino ML, Dosio F, Cattell L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *Int J Nanomed* 2006; 1:297-315.
58. Jacobs C, Duewell P, Heckelsmiller K, Wei J, Bauernfeind F, Ellermeier J, Kisser U, Bauer CA, Dauer M, Eigler A. An ISCOM vaccine combined with a TLR9 agonist breaks immune evasion mediated by regulatory T cells in an orthotopic model of pancreatic carcinoma. *Int. J. Cancer* 2011; 128: 897-907.
59. Jansen T, Hofmans M.P, Theelen MJ, Schijns VE. Structure-activity relations of water- in-oil vaccine formulations and induced antigen-specific antibody responses. *Vaccine* 2005; 23:1053-1060.
60. Jansen T, Hofmans M, Theelen M, Manders F, Schijns V. Structure- and oil type-based efficacy of emulsion adjuvants. *Vaccine* 2006; 24:5400-5405
61. Kakuda T, Sugimoto C, Onuma M. Epitope-mapping of antigen-specific T lymphocyte in cattle immunized with recombinant major piroplasm surface protein of *Theileria sergenti*. *J Vet Med Sci* 2001; 63:895-901.
62. Kamath AT, Rochat AF, Christensen D, Agger EM, Andersen P, Lambert PH. A liposome-based mycobacterial vaccine induces potent adult and neonatal multifunctional T cells through the exquisite targeting of dendritic cells. *PLoS One* 2009; 4:e5771.
63. Kapczynski DR, Tumpey TM. Development of a virosome vaccine for Newcastle disease virus. *Avian Dis* 2003; 47:578-587.
64. Kenney R, Edelman R. Adjuvants for the Future. *New Generation Vaccines* 2000; 2:173-192.
65. Kenney R.T, Edelman R. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev. Vaccines* 2003; 2:167-188.
66. Kim HS, Park YS. Effect of lipid compositions on gene transfer into 293 cells using Sendai F/HN-virosomes. *J Biochem Mol Biol* 2002; 35:459-464.
67. Kramp WJ, Six HR, Kasel JA. Postimmunization clearance of liposome entrapped adenovirus type 5 hexon. *Proc Soc Exp Biol Med* 1982; 169:135-139.
68. Kreuter J, Speiser PP. New adjuvants on a poly (methylmethacrylate) base. *Infect Immun* 1976; 13:204-210.
69. Leserman L, Barois N. Major histocompatibility complex class II molecules, liposomes and antigen presentation. *Medical Applications of Liposomes*, editado por Lasic D y Papahadjopoulos. Elsevier Sciences 1998; 25-45.
70. Leserman L. Liposomes as Protein Carriers in Immunology. *Journal of Liposome Research* 2004; 14:175-189.
71. Levings M, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF- $\beta$  in the differentiation and effector function of T regulatory Cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002; 4: 263-276.
72. Li R, Fang H, Li Y, Liu Y, Pellegrini M, Podda A. Safety and immunogenicity of an MF59-adjuvanted subunit influenza vaccine in elderly Chinese subjects. *Immun Ageing* 2008; 5:2-12.
73. Liebler-Tenorio EM, Pabst R. MALT structure and function in farm animals. *Vet Res* 2006; 37:257-280.
74. Lindenstrom T, Agger EM, Korsholm KS, Darrah PA, Aagaard C, Seder RA. Tuberculosis subunit vaccination provides long-term protective immunity characterized by multifunctional CD4 memory T cells. *J Immunol* 2009; 182:8047-8055.
75. Little SR, Lynn DM, Ge Q, Anderson DG, Puram SV, Chen J, Eisen HN, Langer R. Poly-beta-amino ester-containing microparticles enhance the activity of nonviral genetic vaccines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 29:101:9534-9539.
76. Mallick AI, Singha H, Chaudhuri P, Nadeem A, Khan SA, Dar KA, Owais M. Liposomised recombinant ribosomal L7/L12 protein protects BALB/c mice against *Brucella abortus* 544 infection. *Vaccine* 2007; 25:3692-3704.
77. Maloy KJ, Donachie AM, Mowat AM. Induction of Th1 and Th2 CD4(+) T cell responses by oral or parenteral immunization with ISCOMS. *Eur J Immunol* 1995; 25:2835-41.
78. Maraskovsky E, Sjolander S, Drane DP, Schnurr M, Le TT, Mateo L, Luft T, Masterman KA, Tai TY, Chen Q. NY-ESO-1 protein formulated in ISCOMATRIX adjuvant is a potent anticancer vaccine inducing both humoral and CD8+ T-cell-mediated immunity and protection against NYESO-1+ tumors. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 2879-2890.
79. Marr AK, Kurzman ID, Vail DM. Preclinical evaluation of a liposome-encapsulated formulation of cisplatin in clinically normal dogs. *Am J Vet Res* 2004; 65:1474-1478.
80. Maruyama K. PEG-immunoliposome. *Biosci Rep* 2002; 22: 251-266.

81. Men Y, Corradin G, Thomasin C, Merkle HP, Gander B. Immunopotential of a synthetic antigen by incorporation into biodegradable microspheres, Proc Intern Symp Control Rel Bioact Mater 1994; 21:50-56.
82. Men Y, Thomasin C, Merkle HP, Gander B, Corradin G. A single administration of tetanus toxoid in biodegradable microspheres elicits T cell and antibody responses similar or superior to those obtained with aluminum hydroxide. Vaccine 1995; 13:683-689
83. Moreina B, Hub KF, Abusugrab I. Current status and potential application of ISCOMs in veterinary medicine. Advanced Drug Delivery Reviews 2004; 56: 1367-1382.
84. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, O'Hagan D, Rappuoli R, De Gregorio E. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. Proc Natl Acad Sci 2008; 105:10501-10506.
85. Moser C, Metcalfe IC, Viret JF. Virosomal adjuvanted antigen delivery systems. Expert Rev Vaccines 2003; 2:189-196.
86. Moser C, Amacker M, Zurbriggen R. Influenza virosomes as a vaccine adjuvant and carrier system. Expert Rev Vacc 2011; 10:437-446.
87. Mowat AM, Donachie AM. ISCOMS: a novel strategy for mucosal immunization. Immunol Today 1991; 12:383-385.
88. Newman KD, McBurney MW. Poly-(D,L lactic-co-glycolic acid) microspheres as biodegradable microcarriers for pluripotent stem cells. Biomaterials 2004; 25: 5763-5771.
89. Niborski V, Li Y, Brennan F, Lane M, Torche AM, Remond M, Bonneau M, Riffault S, Stirling C, Hutchings G, Takamatsu H, Barnett P, Charley B, Schwartz-Cornil I. Efficacy of particle-based DNA delivery for vaccination of sheep against FMDV. Vaccine 2006; 24:7204-7213.
90. O'Hagan DT, Jeffery H, Davis SS. Long-term antibody responses in mice following subcutaneous immunization with ovalbumin entrapped in biodegradable Microparticles. Vaccine 1993; 11:965-969.
91. Orive G, Gascón AR, Hernández RM, Domínguez-Gil RA, Pedraz JR. Techniques: New approaches to the delivery of biopharmaceuticals. Trends Pharmacol Sci 2004; 25: 382-387.
92. Osterhaus A, Weijer K, UytdeHaag F, Knell P, Jarrett O, Akerblom L, Morein B. Serological responses in cats vaccinated with FeLV ISCOM and an inactivated FeLV vaccine. Vaccine 1989; 7:137-141.
93. Ott G, Barchfeld GL, Chernoff D, Radhakrishnan R, Van Hoogevest P, Van Nest G. MF59. Design and evaluation of a safe and potent adjuvant for human vaccines. Pharm. Biotechnol 1995; 6:277-296.
94. Ott G., Radhakrishnan R, Fang JH, Hora M. The adjuvant MF59: a ten year perspective. Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols 2001; 42:211-228.
95. Owais M, Gupta CM. Liposome-mediated cytosolic delivery of macromolecules and its possible use in vaccine development. Eur J Biochem 2000; 267:3946-3956.
96. Peek LJ, Middaugh CR, Berkland C. Nanotechnology in vaccine delivery. Adv. Drug Deliver Rev 2008; 60: 915-928.
97. Perrie Y, Mohammed AR, Kirby DJ, McNeil SE, Bramwell VW. Vaccine adjuvant systems: Enhancing the efficacy of sub-unit protein antigens. International Journal of Pharmaceutics 2008; 364:272-280.
98. Poirier VJ, Thamm DH, Kurzman ID, Jeglum KA, Chun R, Obradovich JE, O'Brien M, Fred RM 3rd, Phillips BS, Vail DM. Liposome-encapsulated doxorubicin (Doxil) and doxorubicin in the treatment of vaccine-associated sarcoma in cats. J Vet Intern Med 2002; 16726-731.
99. Radosevic K, Rodriguez A, Mintardjo R, Tax D, Bengtsson KL, Thompson C. Antibody and T-cell responses to a virosomal adjuvanted H9N2 avian influenza vaccine: impact of distinct additional adjuvants. Vaccine 2008; 26:3640-6.
100. Ravindran R, Bhowmick S, Das A, Ali N. Comparison of BCG, MPL and cationic liposome adjuvant systems in leishmanial antigen vaccine formulations against murine visceral leishmaniasis. Abstract BMC Microbiology 2010; 10:181 <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/181>
101. Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, Lee LK, Swartz MA, Hubbell JA. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines. Nat Biotechnol 2007; 25:1159-1164.
102. Reed S, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. Trends in Immunology 2009. 30:23-32.
103. Relyved E, Bizzini B, Gupta R.K. Rational approaches to reduce adverse reactions in man to vaccines. Trends in immunology 1998; 2:573-580.
104. Rimmelzwaan GF, Baars M, van Beek R, van Amerongen G, Lovgren-Bengtsson K, Claas EC, Osterhaus AD. Induction of protective immunity against influenza virus in a macaque model:

- comparison of conventional and iscom vaccines. *J Gen Virol* 1997; 78:757-765.
105. Ronnberg B, Fekadu M, Morein B. Adjuvant activity of non-toxic Quillaja saponaria Molina components for use in ISCOM matrix. *Vaccine* 1995; 13:1375-1382.
  106. Rosas JE, Pedraz JL, Hernández RM, Gascón AR, Igartua M, Guzmán F, Rodríguez R, Cortés J, Patarroyo ME. Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunization of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine* 2002; 20: 1707-1710.
  107. Scalzo A.A, Elliott S.L, Cox J, Gardner J, Moss D.J, Suhrbier A. Induction of protective cytotoxic T cells to murine cytomegalovirus by using a nonapeptide and a human-compatible adjuvant (Montanide ISA 720). *J Virol* 1995; 69:1306-1309.
  108. Schnurr M., Chen Q, Shin A, Chen W, Toy T, Jenderek C, Green S, Miloradovic L, Drane D, Davis ID. Tumor antigen processing and presentation depend critically on dendritic cell type and the mode of antigen delivery. *Blood* 2005; 105:2465-2472.
  109. Schnurr M, Orban M, Robson NC, Shin A, Braley H, Airey D, Cebon J, Maraskovsky E, Endres S. ISCOMATRIX adjuvant induces efficient cross-presentation of tumor antigen by dendritic cells via rapid cytosolic antigen delivery and processing via tripeptidyl peptidase II. *J. Immunol* 2009; 182:1253-1259.
  110. Schultze V, D'Agosto V, Wack A, Novicki D, Zorn J, Hennig R. Safety of MF59 adjuvant. *Vaccine* 2008; 26:3209-3022.
  111. Shoji J, Tanihara Y, Uchiyama T, Kawai A. Preparation of virosomes coated with the vesicular stomatitis virus glycoprotein as efficient gene transfer vehicles for animal cells. *Microbiol Immunol* 2004; 48:163-174.
  112. Singh M, Singh A, Talwar GP. Controlled delivery of diphtheria toxoid using biodegradable poly (D,L-lactide) microcapsules. *Pharm Res* 1991; 8: 958-96.
  113. Storni T, Kundig TM, Senti G, Johansen P. Immunity in response to particulate antigen-delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2005; 57:333-355.
  114. Takahashi H, Takeshita T, Morein B, Putney S, Germain RN, Berzofsky JA. Induction of CD8+ cytotoxic T cells by immunization with purified HIV-1 envelope protein in ISCOMs. *Nature* 1990; 344:873-875.
  - 115.
  116. Tana WS, Lee JT, Onuma M, Ochiai K, Kakidani H, Yasuda T. In vivo antitumor effect of cationic liposomes containing diphtheria toxin A-chain gene on cells infected with bovine leukemia virus. *J Vet Med Sci* 1997; 59:617-619.
  117. Thiele L, Rothen-Rutishauser B, Jilek S, Wunderli-Allenspach H, Merkle HP, Walter E. Evaluation of particle uptake in human blood monocyte-derived cells in vitro. Does phagocytosis activity of dendritic cells measure up with macrophages. *J Control Release* 2001; 76:59-71.
  118. Tyrrell DA, Heath TD, Colley CM, Ryman BE. New aspects of liposomes. *Biochim Biophys Acta* 1976; 457:259-302.
  119. Tritto E, Mosca F, De Gregorio E. Mechanism of action of licensed vaccine adjuvants. *Vaccine* 2009; 27: 3331-3334.
  120. Trudel M, Boulay G, Seguin C, Nadon F, Lussier G. Control of infectious bovine rhinotracheitis in calves with a BHV-1 subunit-ISCOM vaccine. *Vaccine* 1988; 6:525-529.
  121. U'Ren LW, Biller BJ, Elmslie RE, Thamm DH, Dow SW. Evaluation of a novel tumor vaccine in dogs with hemangiosarcoma. *J Vet Intern Med* 2007; 21:113-120.
  122. Vajdy M, Selby M, Medina-Selby A, Coit D, Hall J, Tandeske L. Hepatitis C virus polyprotein vaccine formulations capable of inducing broad antibody and cellular immune responses. *J Gen Virol* 2006; 87:2253-2262.
  123. Valensi J.M, Carlson J.R, Van Nest G.A. Systemic cytokine profiles in BALB/c mice immunized with trivalent influenza vaccine containing MF59 oil emulsion and other advanced adjuvants. *J Immunol* 1994; 153:4029-39.
  124. Van Rooijen N, van Nieuwmegen R. Use of liposomes as biodegradable and harmless adjuvants. *Methods Enzymol* 1983; 93:83-95.
  125. Visser IK, Vedder EJ, van de Bildt MW, Orvell C, Barrett T, Osterhaus AD. Canine distemper virus ISCOMs induce protection in harbour seals (*Phoca vitulina*) against phocid distemper but still allow subsequent infection with phocid distemper virus-1. *Vaccine* 1992; 10:435-438.
  126. Wack A, Baudner BC, Hilbert AK, Manini I, Nuti S, Tavarini S. Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2008; 26:552-561.
  127. Wilschut J. Influenza vaccines: The virosome concept *Immunology Letters* 2009; 122:118-121.
  128. Wu Y, Ellis R D, Shaffer D. Phase I trial of malaria transmission blocking vaccine candidates Pfs25 and Pvs25 formulated with montanide 2008. *Plos One* 3: e2636.

129. Zheng L, Huang XL, Fan Z, Borowski L, Wilson CC, Rinaldo, Jr. CR. Delivery of liposome-encapsulated HIV type 1 proteins to human dendritic cells for stimulation of HIV type 1-specific memory cytotoxic T lymphocyte responses. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999; 15:1011-1020.
130. Zolnik B, Gonzales-Fernández A, Sandrieh N, Dobrovolskaia MA. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology* 2010; 151: 458-465.
131. Zurbriggen R, Gluck R. Immunogenicity of IRIV versus alum-adjuvanted diphtheria and tetanus toxoid vaccines in influenza primed mice. *Vaccine* 1999; 17:1301-1305.
132. Zurbriggen R. Immunostimulating reconstituted influenza virosomes. *Vaccine* 2003; 21:921-924.