

Proteoliposoma: corazón de VA-MENGOC-BC® y plataforma de adyuvantes

Proteoliposome: VA-MENGOC-BC® core and adjuvant platform

Oliver Pérez*, Miriam Lastre

Instituto Finlay, Centro de Investigación-Producción de Vacunas. Ave 27, No 19805, La Lisa, AP 16017, Cod 11600. La Habana, Cuba.

email: oliverp@finlay.edu.cu

VA-MENGOC-BC® está compuesta por proteínas, fosfolípidos y lipopolisacárido (LPS) de la membrana externa de *Neisseria meningitidis* serogrupo B y polisacárido (Ps) capsular de meningococo C. Las primeras forman nanovesículas que contienen múltiples proteínas protectogénicas y varios patrones moleculares asociados a microbios (MAMP, por su sigla en inglés) de acción sinérgica. Entre ellos se destacan: el LPS, la PorB y trazas de ADN bacteriano. Estos son los responsables de su potente acción como adyuvante y de ser reconocidos por los receptores tipo Toll (TLR)-4, TLR-2 y TLR-9. Su gran contenido proteico, con cinco proteínas mayoritarias y varios MAMPs, así como su extracción de la membrana externa bacteriana, lo distinguen radicalmente de los liposomas y de ahí su denominación de proteoliposoma (PL), preferiblemente al ser usados como adyuvantes vacunales.

Los adyuvantes se han clasificado de múltiples formas. No obstante, se destacan dos clasificaciones funcionales: la primera, basada en facilitadores de señales (1, 2) y la segunda, los divide en inmunopotenciadores y sistema de reparto ('delivery system') (3).

La adición a esta última clasificación de los inmunopolarizadores (4) disminuye la empiricidad en el empleo de los adyuvantes requeridos para inducir respuestas protectoras, según la respuesta vacunal que se necesite, ya sea Th1 frente a inmunógenos virales, tumorales, parasitarios, bacterianos, alérgenos o Th2 frente a los helmintos.

Para desarrollar una estrategia de adyuvantes propios se requería contar con sistemas de tamizaje de la respuesta inmune en murinos y en humanos, y con sistemas confirmatorios. En el primero, se empleó la determinación de subclases de IgG específicas por ELISA que permitieran evaluar la respuesta inmune en poblaciones y determinar con certeza si se inducían anticuerpos fijadores de complemento y con acción opsonofagocítica (IgG2a en ratones BALB/c, IgG2c en C57Bl/6 e IgG1 e IgG3 en humanos) sugestivos de un patrón Th1. Esta conllevó a un jalón importante en el entendimiento de que la mayoría de los anticuerpos provenían de un patrón Th1, de los que dependían las acciones funcionales, como la actividad bactericida, entre otros.

En el segundo, se seleccionó la inducción de IFN γ , IL-12 (como indicadores Th1), la producción de IgE específica y la inducción de IL-5 (como indicadores Th2) confirmatorios. El

VA-MENGOC-BC® consists of proteins, phospholipids and lipopolysaccharides (LPS) of the outer membrane vesicle from *Neisseria meningitidis* serogroup B and capsular polysaccharide (Ps) from *Neisseria meningitidis* serogroup C. The former forms nanovesicles containing multiple protective proteins and several molecular patterns associated to microbes (MAMP) of synergic action, such as LPS; PorB and traces of bacterial DNA. They are the responsible of its strong action as adjuvant and of being recognized by Toll like receptors (TLR)-4, TLR-2 and TLR-9. Their great protein content with five majority proteins and various MAMPs, as well as their extraction from the bacterial outer membrane, distinguish them radically from liposomes, that is why they are known as proteoliposome (PL), mainly when used as vaccinal adjuvants.

Adjuvants have been classified in different ways. Nevertheless, there are two functional classifications: the first one is based on signal facilitators (1, 2) while the second one divide them into immunopotentiators and delivery system (3). The addition of immunopotentiators to the latter classification (4) decreases empiricism in using adjuvants required to induce protective responses according to the vaccinal response needed, either Th1 against viral, tumoral, parasitic, allergen immunogens or Th2 against helminths.

To develop a strategy of own adjuvants it was necessary to have screening systems of the immune response in murine and in humans, and also confirmatory systems. The determination of specific IgG subclasses by ELISA that permitted the evaluation of the immune response in populations and the determination of whether it induced complement fixing antibodies with opsonophagocytic action (IgG2a in mice BALB/c, IgG2c in C57Bl/6 and IgG1 and IgG3 in humans) suggesting a Th1 pattern was used in the former. This was an important point in the understanding that most antibodies come from a Th1 pattern from where functional actions, like bactericidal activity, depended. While in the latter, the induction of IFN γ , IL-12 (as Th1 indicators), the production of specific IgE and the induction of IL-5 (as Th2 indicators) was chosen. This design was characterized by savings when determining class (IgE), subclasses and essential cytokines.

In the formulation of VA-MENGOC-BC®, PsC is included, which is bound to outer membrane proteins of proteoliposome coadjuvating it (5, 6), in such a way that response induced by

* Doctor en Medicina, Doctor en Ciencias Médicas, Profesor Titular y Presidente de la Sociedad Cubana de Inmunología.

ahorro, al solo determinar la clase (IgE), las subclases y las citocinas esenciales primó en este diseño.

VA-MENGOC-BC® incluye el PsC en su formulación, el que está unido con las proteínas de membrana externa del proteoliposoma que la adyuva (5, 6), de tal forma que la respuesta inducida por el PsC sea también muy eficaz en los niños menores de un año de edad, protegiéndolos adecuadamente, tanto contra *N. meningitidis* del serogrupo B, como del serogrupo C. Ambos componentes vacunales se caracterizan por inducir un patrón Th1 que ha justificado su empleo a los 3 y 5 meses de edad, esquema empleado en Cuba desde hace 25 años. En este país, las tasas de incidencia de enfermedad meningocócica se mantienen por debajo de 0,1 x 100.000 habitantes desde hace varios años y no se ha detectado ningún caso producido por *N. meningitidis* del serogrupo C, todo lo cual demuestra en la práctica médica su efectividad en ese grupo de edad.

La inducción preferencial de una respuesta inmune polarizada hacia un patrón Th1 del Adyuvante Finlay Proteoliposoma 1 (AFPL1) permite su aplicación a vacunas contra alérgenos que inducen una respuesta Th2 (7). Los ensayos experimentales, la toxicología preclínica y la estabilidad se concluyeron usando alérgenos del ácaro *Dermatophagoides siboney*, lo que demostró el cambio hacia un patrón Th1/T regulatorio y se aprobó el ensayo clínico Fase I, el cual se encuentra en curso. Adicionalmente al AFPL1 se desarrolla un derivado del PL denominado AFCo1 (cocleato) (8). Este conserva sus constituyentes del parenteral y lo hace más resistente y efectivo no solo por vía parenteral, sino también por la mucosa. El AFCo1 se ha explorado con múltiples inmunógenos vacunales por vía nasal, oral, vaginal y rectal (9). La vía nasal ha sido la más efectiva.

Como los adyuvantes Finlay contienen fosfolípidos y adicionalmente el AFCo1 contiene Ca²⁺ que permiten la interacción con la membrana, se determinó su capacidad de inducir presentación cruzada y linfocitos T citotóxicos (10). Estos hallazgos fueron sorprendentes por provenir estos adyuvantes de bacterias extracelulares y no lo tradicional de ser inducida por virus, tumores y bacterias intracelulares. El contar con adyuvantes que funcionaran en los infantes nos permitió abordar un problema serio y no resuelto asociado a la malaria. Demostramos en modelos murinos que en la placenta se induce tolerancia; además de un incremento de los abortos, los nacidos muertos, la anemia y el bajo peso al nacer, asociados a la marginalización de los trofozoitos. Esto se debe a que se produce necrosis en la placenta, la que es más efectiva al final de la gestación y pasan los antígenos de malaria al feto, siendo estos reconocidos como propios (11). Esto explica porqué los niños menores de un año en países endémicos mueren fundamentalmente de anemia y posteriormente de inmunopatología. Nuestros adyuvantes rompen la tolerancia a los antígenos de malaria.

El contar con adyuvantes de aplicación parenteral y mucosal permitió abordar otro serio problema de la vacunología: las coberturas de vacunación. Esto ha posibilitado la disminución de las vacunas multidosas a dos 'priming' simultáneos (SinTimVaS, single time vaccination strategy): uno parenteral y el otro mucosal, con la inducción de una respuesta cualitativamente superior al estimular, además de

PsC is equally efficient in infants adequately protecting them from *N. meningitidis* serogroups B and C.

Both vaccinal components are characterized by inducing a Th1 pattern that has justified its use at 3 and 5 months old, scheme used in Cuba for 25 years. In Cuba, the incidence rate of meningococcal disease is below 0.1 x 100.000 inhabitants since many years ago and no cases caused by *N. meningitidis* serogroup C have been detected, which demonstrate the effectiveness of the vaccine in this age group. The preferential induction of an immune response polarized towards a Th1 pattern of the Finlay Proteoliposome Adjuvant 1 (AFPL1, acronym in Spanish) allows its application against allergens that induce a Th2 response (7).

Experimental assays, pre clinical toxicology and stability were concluded using allergens from mite *Dermatophagoides siboney*, which demonstrated the change towards a regulatory pattern Th1/regulatory T and the phase I clinical assay, which is in progress, was approved.

In addition, a derivative from PL named AFCo1 (cocleate) (8). It keeps its constituents from the parental and makes it more resistant and effective not only by parenteral route but also through mucosa. AFCo1 have been studied with several vaccinal immunogens by nasal, oral, vaginal and rectal route (9), being the nasal one the most effective.

Since Finlay adjuvants contain phospholipids and AFCo1 also contains Ca²⁺ for membrane interaction, they induce cross presentation and cytotoxic lymphocytes T (10). These findings were interesting since these adjuvants were from extra cellular bacteria and not from the traditional induction by viruses, tumours and intracellular bacteria.

Having adjuvants that worked with infants allowed us to cope with a serious and non-solved problem related to malaria. We demonstrated in murine models that tolerance is induced in placenta, as well as increase of miscarriages, dead births, anemia and low weight at birth due to marginalization of trophozoites. This is due to necrosis in the placenta, which is more effective at the end of pregnancy and the malaria antigens are passed to the fetus, being the antigens recognized as his own (11). This explains why 1 year old infants in endemic countries died mainly from anemia and immunopathology. Our adjuvants break tolerance to malaria antigens.

Besides, having adjuvants with parenteral and mucosal application permitted to face another serious problem of vaccinology: vaccination coverage. This contributes to the reduction of multidosed vaccines to two simultaneous 'priming' (SinTimVaS, single time vaccination strategy): one parenteral and the other one mucosal, with the induction of a qualitatively superior response at stimulating also the systemic response of secretatory IgA (12).

Determining that LPS is the main MAMP of Finlay adjuvants (13) and the need of manufacturing big quantities for veterinary use made us develop adjuvants only with MAMP (14). They

la respuesta sistémica de IgA secretoria (12). El determinar que el LPS es el principal MAMP de los adyuvantes Finlay (13) y la necesidad de producir grandes cantidades para su uso veterinario nos conllevó al desarrollo de adyuvantes con solo MAMP (14). Estos son la serie de los AFCo3 que son también efectivos por vía oral y parecen promisorios en la acuicultura.

Perspectivas en los próximos cinco años

- Concluir la producción del AFCo1 en un sistema de buenas prácticas de fabricación (GMP, por su sigla en inglés), así como su estabilidad y estudios de toxicología preclínica.
- Llevar el AFCo1 a la práctica clínica contra los inmunógenos propios o heterólogos por vía mucosal.
- Contar con una vacuna adyuvada a base de AFPL1/alúmina contra *D. siboney* que revierta el concepto de múltiples dosis de la inmunoterapia actual y su extensión a otros alérgenos.
- Determinar la efectividad de las vacunas unitemporales (SinTimVaS).
- Determinar la efectividad en humanos de la adyuvación de vacunas polisacáridicas.
- Explorar la reversión de tolerancia de malaria en humanos.
- Expandir el uso de los adyuvantes a vacunas veterinarias.

Agradecimientos

A los actuales miembros del Departamento de Inmunología, a los que han trabajado y se han formado en él, a los que son los principales actores de estos resultados y al Instituto Finlay, quien ha ofrecido el soporte de estas investigaciones.

Referencias / References

1. Schijns VE Immunological concepts of vaccine adjuvant activity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:456-63.
2. Ribeiro CM, Schijns VE. Immunology of vaccine adjuvants. *Methods Mol Biol* 2010; 626:1-14. doi: 10.1007/978-1-60761-585-9_1.
3. O'Hagan D, Valiante NM. Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nature Rev* 2003; 2:727-35.
4. 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; 3:762-64.
5. Pérez O, Romeu B, Lastre M, Zayas C, González E, Balboa J, et al. Adyuvantes para vacunas polisacáridicas. Cuba patente OCPI: PCT/CU2012/000006. 2013 may 10.
6. Romeu B, González E, Zayas C, Del Campo J, Acevedo R, Cuello M, et al. AFCo1 as nasal adjuvant of capsular polysaccharide Neisseria meningitidis serogroup C induces systemic mucosal immune responses. *Scand J Inf Dis* 2011; 43:809-13.
7. Lastre M, Pérez O, Labrada A, Bidot I, Pérez JE, Bracho G, et al. Composición vacunal contra las alergias y método para su obtención. Cuba patente OCPI: PCT/CU2003/000007 y WO2003094964 A1. 2003 nov 20.
8. Pérez O, Barberá F, Bracho G, Campa C, Campo JM, Gil D, et al. Método de obtención de estructuras cocleares. Composiciones vacunales y adyuvantes basados en estructuras cocleares y sus intermediarios. Cuba patente OCPI: PCT/CU2003/000016 y WO2004047805 A1. 2004 jun 10.
9. Cabrera O, Cuello M, Thörn K, Lindqvist M, Lastre M, González E, et al. Influencia de las vías de inmunización mucosales sobre la protección contra herpes simple tipo 2 con el AFCo1 como adyuvante. *VacciMonitor* 2011; 20(3):14-20.
10. Pérez O, Lastre M, Rodríguez T, Bracho G, Mastroeni G, Del Campo JM, et al. Proteoliposomas y sus derivados como adyuvantes inductores de respuesta citotóxica y las formulaciones resultantes. Cuba patente OCPI: PCT/CU2004/000017 y WO/2005/063287. 2005 jul 14.
11. Pérez O, Cuello M, Cabrera O, Balboa J, Lastre M, Zayas C, et al. Tolerógenos adyuvados como vacuna de malaria. Cuba patente OCPI: PCT/CU2011/000002 y WO2011137876 A2. 2011 nov 10.
12. Pérez O, González E, Romeu B, Del Campo JM, Acevedo R, Lastre M, et al. Vacunas Unitemporales. Cuba patente OCPI: CU20080215 y WO2010057447A1. 2009 nov 19.
13. Rodríguez T, Pérez O, Ménager N, Ugrinovic S, Bracho G, Mastroeni P. Interactions of proteoliposome from serogroup B Neisseria meningitidis with bone marrow-derived dendritic cells and macrophages: adjuvants and antigen delivery. *Vaccine* 2005; 23:1312-21.
14. Pérez O, González E, Cabrera O, Zayas C, Sifontes S, Balboa JA, et al. Cocleato con solo MAMP. Cuba patente OCPI: CU/P/2011/123. 2011 may 31.

correspond to the series AFCo3 which are also effective orally and seem to be promising in aquaculture.

Perspectives for the next five years

- To finish the production of AFCo1 in a system of good manufacturing practices (GMP), as well as its stability and pre clinical toxicology studies.
- To use AFCo1 against own or heterologous immunogens by mucosal route in clinical practice.
- To have an adjuvated AFPL1/alumin-based vaccine against *D. siboney* that changes the concept of multiple doses of current immunotherapy and its extension to other allergens.
- To determine the effectiveness of unitemporal vaccines (SinTimVaS).
- To determine effectiveness of adjuvants for polysaccharide vaccines in humans.
- To explore reversion of malaria tolerance in humans.
- To spread the use of adjuvants to veterinary vaccines.

Acknowledgments

To current members of the Department of Immunology, who have worked and learned in it, for they have being important for these results and to Finlay Institute.