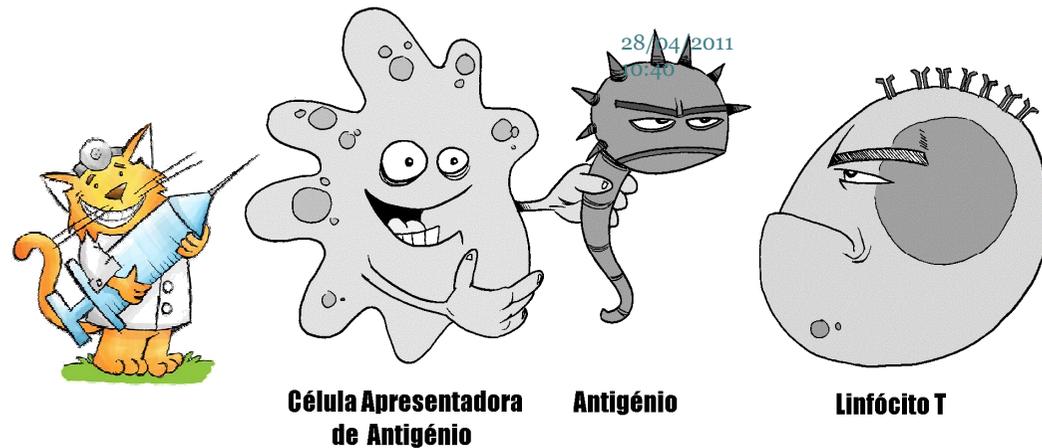


## Adjuvantes e vias de administração de vacinas

**Kátia Bacelo**

Abril de 2011



# Tópicos a serem abordados...

1. Resposta imune – revisão
2. Vacinas – breve comentário
3. Adjuvantes - conceito
4. Adjuvantes - classificação
5. Adjuvantes – exemplos
6. Vias de administração de vacinas

# Resposta imune

## Inata

- Natural ou nativa
- Presente desde o nascimento
- PAMPS – Pathogen associated molecular pattern

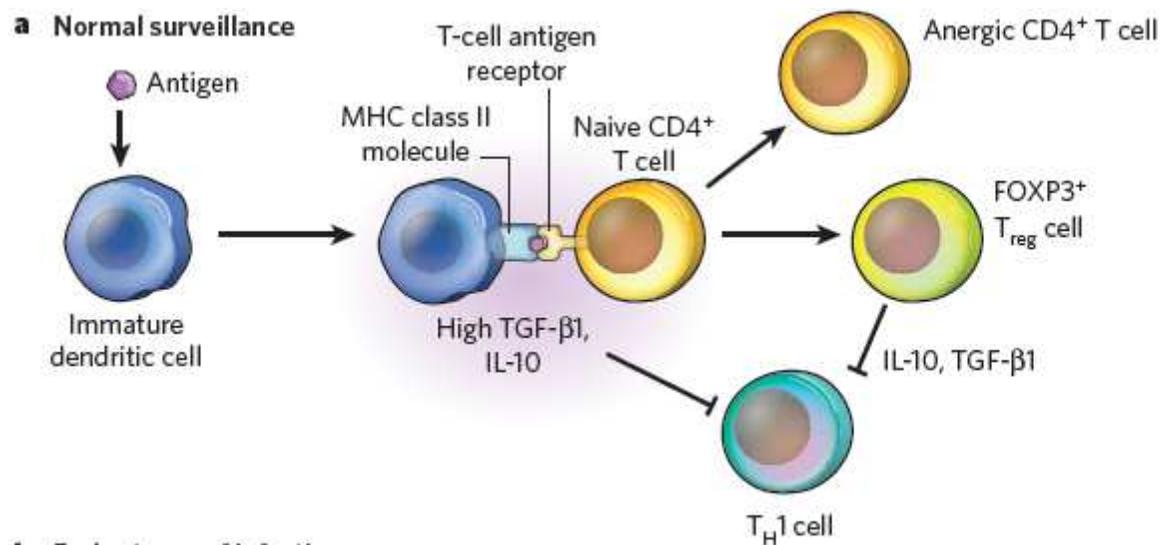
**Sinais de perigo**

## Adquirida

- Adaptável ou específica
- Confere imunidade protetora contra re-infecções
- Respostas altamente específicas;
- Somente vertebrados elaboram respostas adquiridas

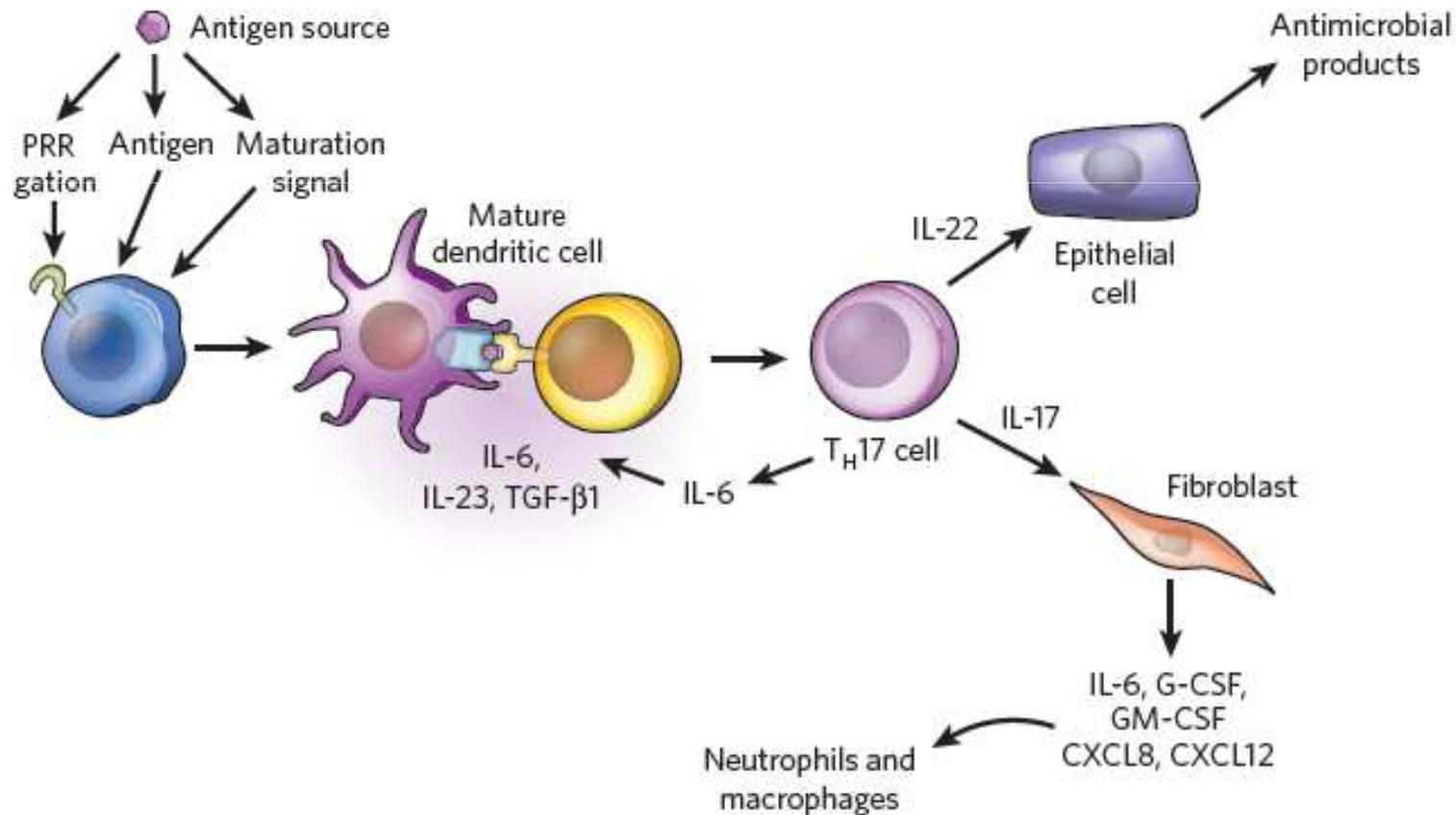
# Ativação de células T CD4+

- Sem co-estimulação

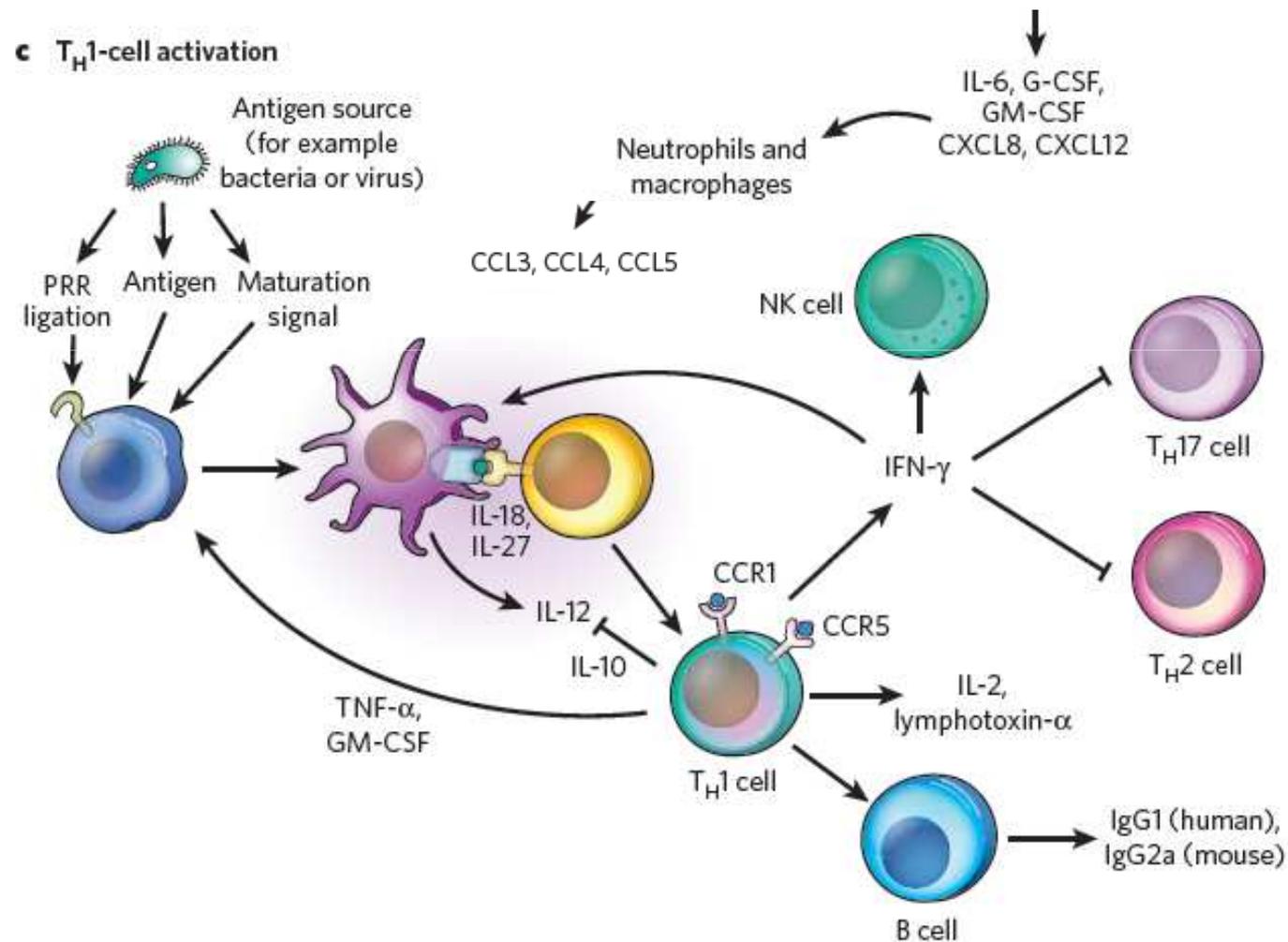


# Ativação de células T CD4+

## b Early stages of infection

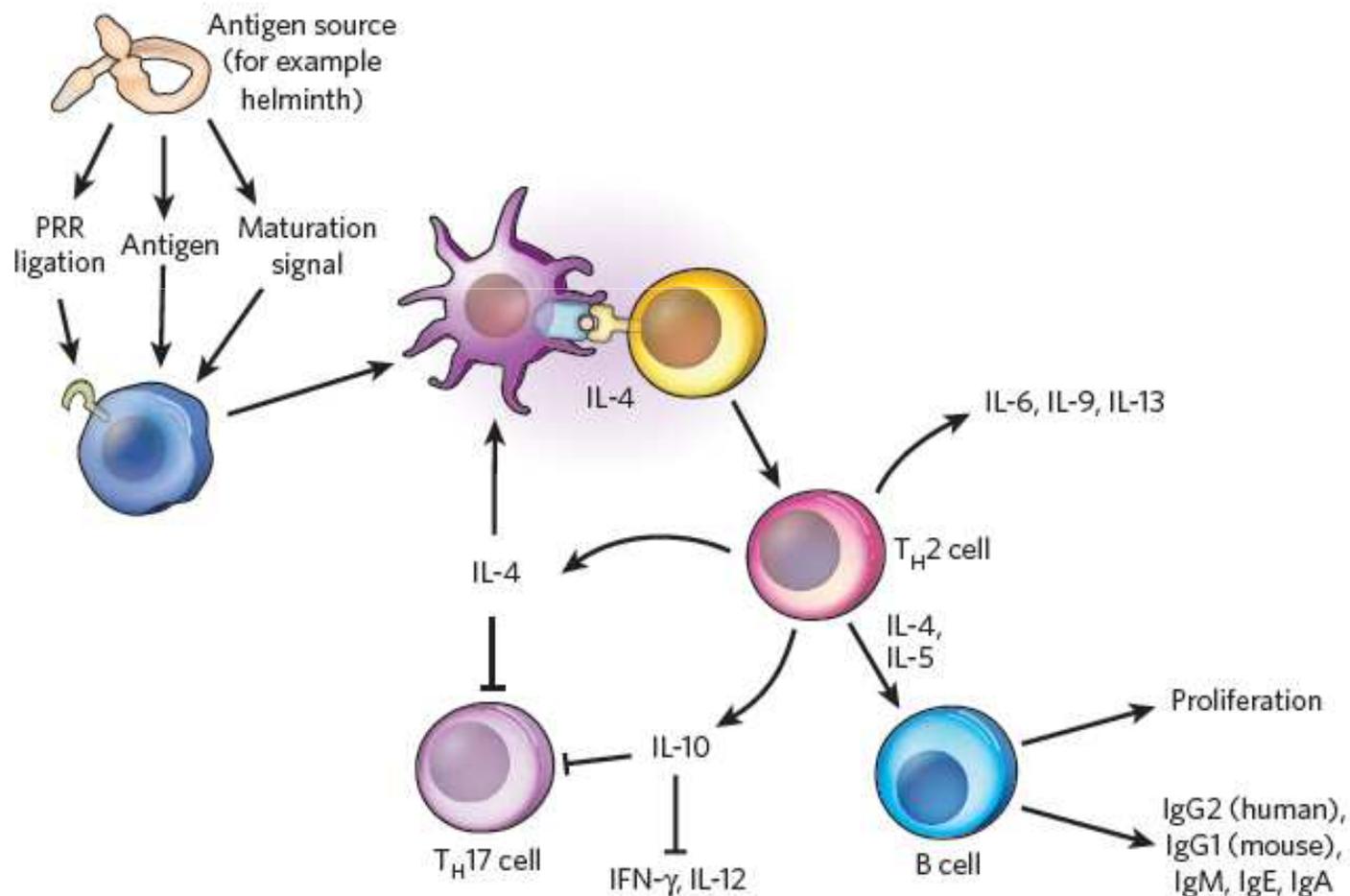


# Ativação de células T CD4+



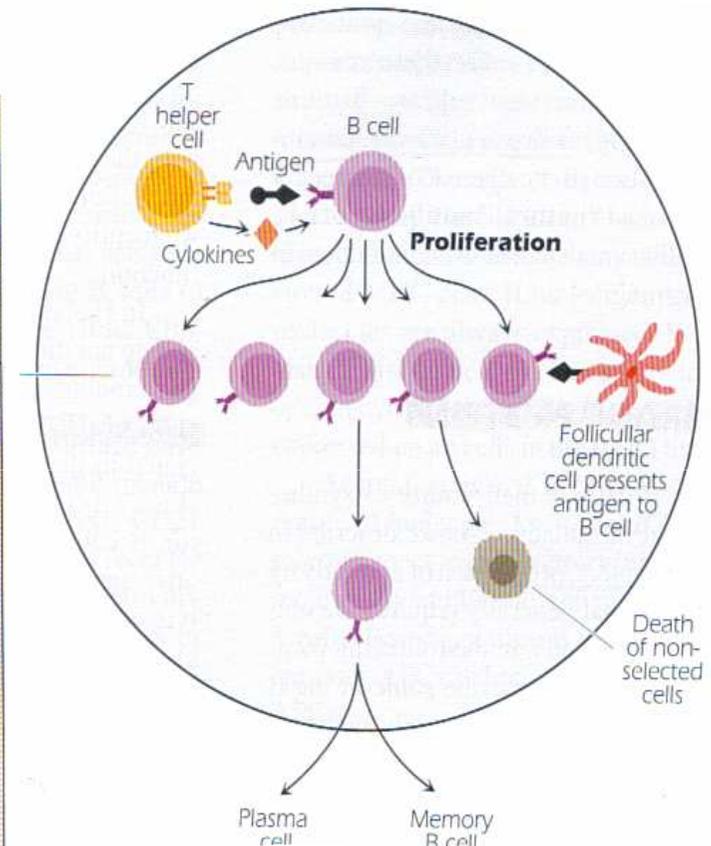
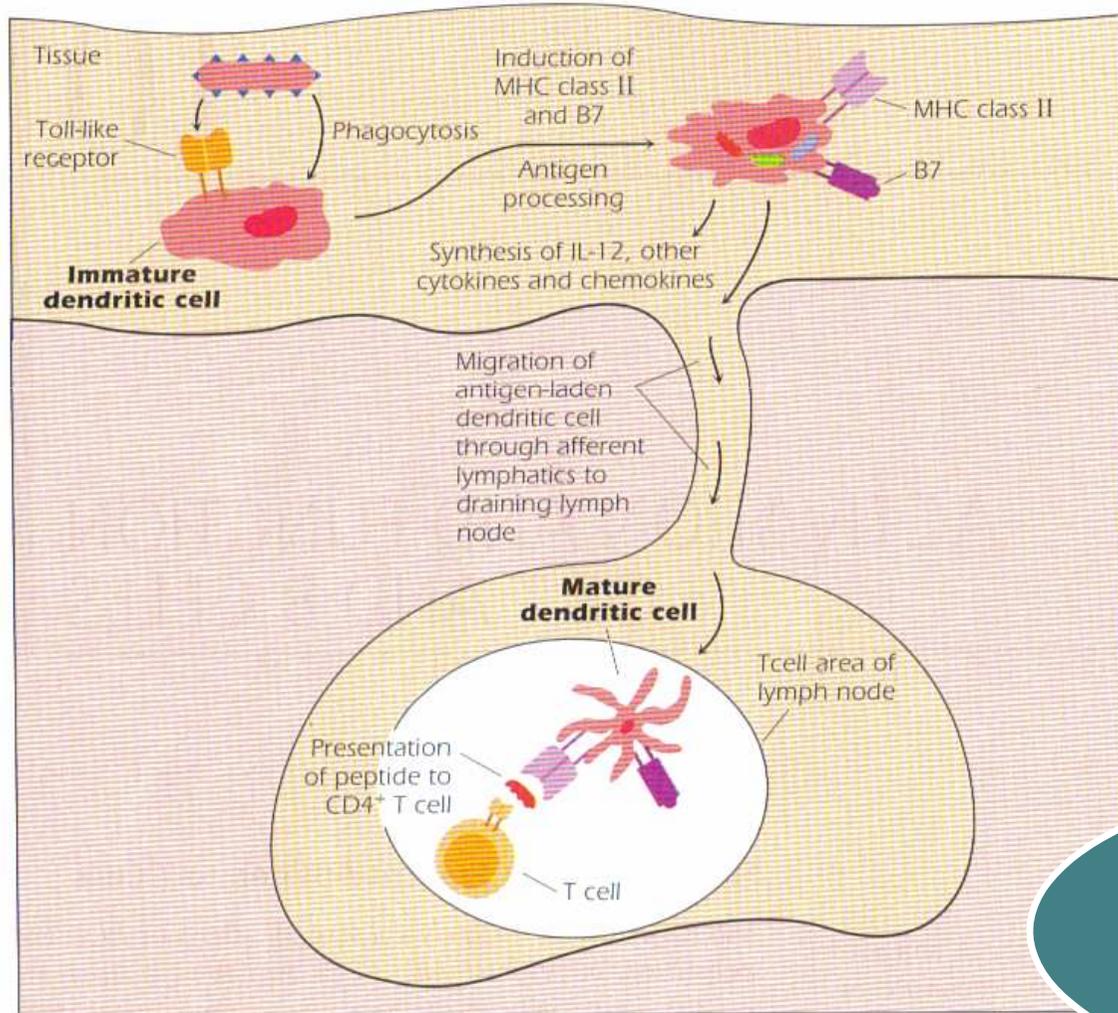
# Ativação de células T CD4+

## d T<sub>H</sub>2-cell activation





# O Mecanismo da vacina

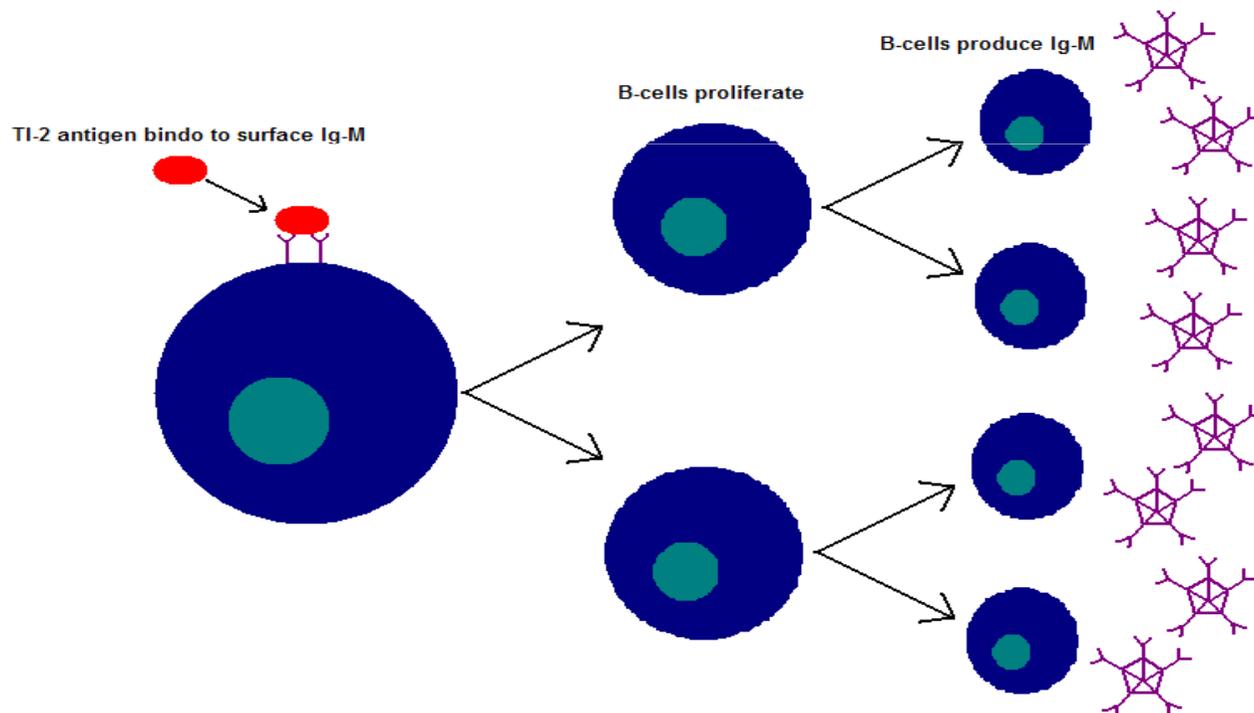


Objetivo: Gerar células de memória!!

# Ativação direta de células B

(Ag T independentes)

- Em geral polissacarídeos → mesmo determinante antigênico repetido muitas vezes



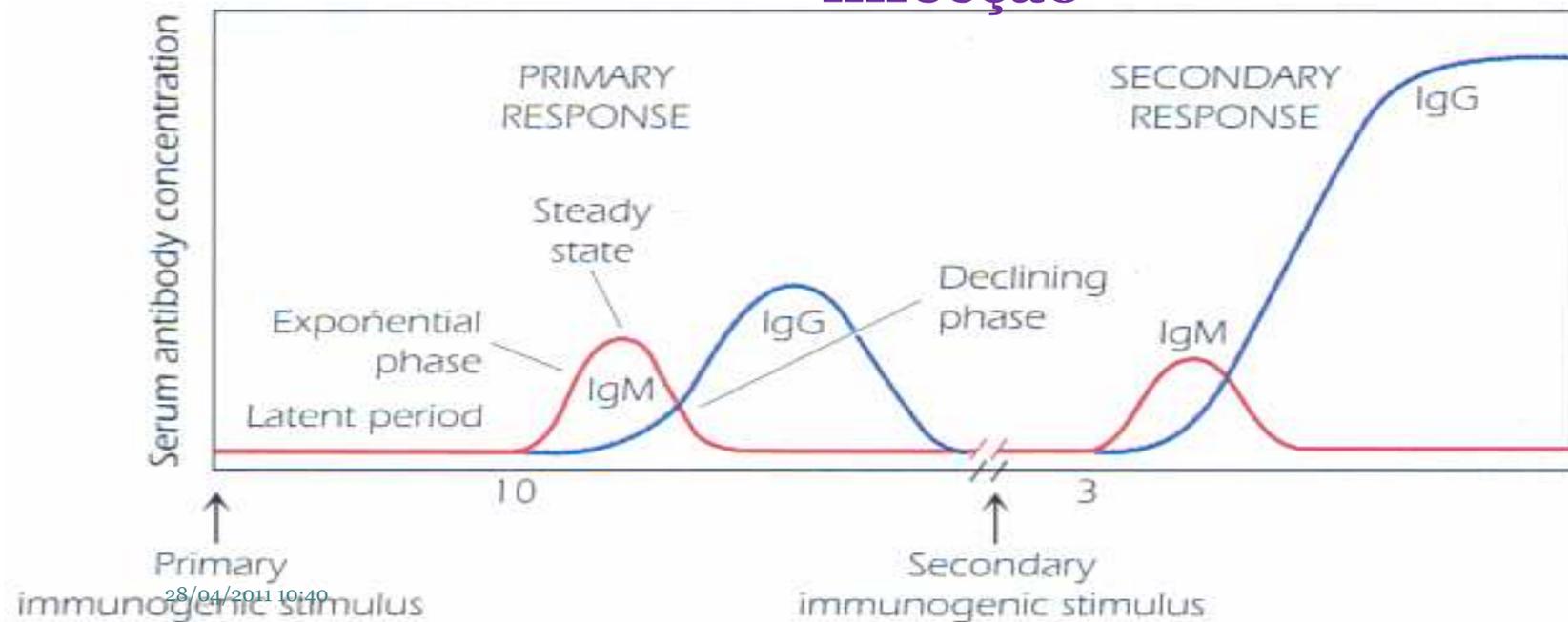
- Resposta exclusivamente IgM → Não gera células de memória

# A importância da resposta imune secundária

- Resposta imune secundária → mais rápida e robusta

Logo →

Depuração do patógeno do organismo antes que ele consiga causar uma infecção



## Resposta imune protetora

### Anticorpo neutralizante

- Toxinas colérica e diftérica
- Vírus

### Resposta celular

- Morte celular – bactérias intracelulares

### Anticorpo opsonizante

# Vacina celular x recombinante

Tipo de Vacina	Vantagens	Desvantagens
Viva atenuada	Reproduz infecção natural Bom nível de proteção Induz imunidade na população	Possível reversão para tipo selvagem Prazo de validade limitado
Morta	Segura contra reversão Estável para transporte e estocagem Aceitável para imunocomprometidos	Menos eficaz que as vacinas vivas Necessário + 1 dose Não induz imunidade da população
Subunidade	Composição conhecida Produção em larga escala Sem risco de patogenicidade	Resposta humoral Múltiplas doses <b>Baixa imunogenicidade</b>

# Vacina celular x recombinante

↑  
**IMUNOGENICIDADE**

**Tradicionais**

**Recombinantes**

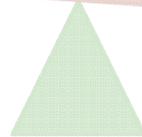
Proteínas

Altamente purificadas

PAMPs  
(DNA bacteriano, LPS...)

Menor carga de Ag

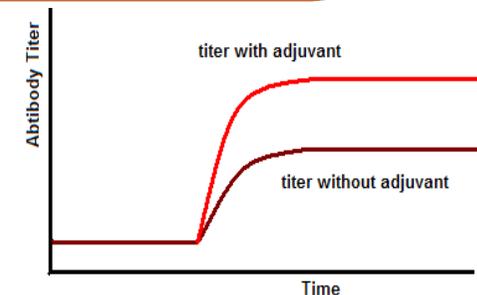
Falta de características do patógeno original



# Adjuvantes - Conceito

- Originária do Latin, “adjuvare,” significa “to help”. Descritos por Ramon (1924) como:

“Substâncias utilizadas em combinação com um antígeno específico que produzem uma resposta imune mais acentuada que a produzida pelo antígeno sozinho”.



## Adjuvantes interferem na resposta imune de várias maneiras...

- Por aumentar a imunogenicidade de antígenos fracos
- Por reforçar a duração da resposta imune
- Por estimular e modular resposta imune humoral (isotipos de Ac)
- Por estimular a imunidade mediada por células
- Por aperfeiçoar a imunidade de mucosa
- Por diminuir a dose de antígeno requerida

## Tipos de Adjuvantes ...

### Adjuvantes imunoestimulatórios

- Ativam diretamente sistema imune através de receptores específicos como **toll-like receptors (TLRs)**

### Sistemas de veiculação de vacinas

- “Entregam” antígeno para APC – **alcance de linfonodos**
- Tamanho comparável ao patógeno
- Restringe efeitos adversos?

# Adjuvantes imunoestimulatórios

**Table 1**

Selected adjuvants and moieties recognised by TLRs

Adjuvant/moiety	Cellular location	TLR designation
Triacyl lipoproteins	Cell surface	TLR 1
Gram positive peptidoglycan; lipoproteins; lipoteichoic acids; fungi; viral glycoproteins	Cell surface	TLR 2
dsRNA/Poly I:C (synthetic dsRNA analog)	Cell compartment	TLR 3
Monophosphoryl lipid A (MPL)/synthetic lipid A mimetics	Cell surface	TLR 4
Flagellin	Cell surface	TLR 5
Diacyl lipoproteins	Cell surface	TLR 6
ssRNA/guanosine analogue, Loxoribine	Cell compartment	TLR 7
Small synthetic compounds; ssRNA	Cell compartment	TLR 8
Unmethylated CpG DNA	Cell compartment	TLR 9
Unknown	Cell surface	TLR 10
Profilin	Cell surface	TLR 11

# PRRs e seus PAMPs

**Table 2 | Examples of PRRs, their PAMP ligands and associated immune responses**

PRR	Ligand	Associated immune response	Synthetic analogue	Biomaterials engineering approaches	Induced immune response
<b>TLRs</b>					
TLR3	Double-stranded RNA	Induces type I IFNs and pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-12) <sup>16,85</sup>	Poly(I:C) <sup>55</sup>	pH-sensitive biodegradable polyketals co-encapsulating ion-paired protein antigen and poly(I:C) into ~1–3- $\mu$ m-diameter particles <sup>55</sup>	Increased the number of IFN- $\gamma$ -producing antigen-specific CD8 <sup>+</sup> T cells; elicited TNF- $\alpha$ and IL-2 production by CD8 <sup>+</sup> T cells <i>in vitro</i> <sup>55</sup>
				Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres co-encapsulating protein antigen with poly(I:C) <sup>79</sup>	Increased the number of IFN- $\gamma$ -producing antigen-specific CD8 <sup>+</sup> T cells <i>in vivo</i> <sup>79</sup>
TLR4	LPS	Induces IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$ ; upregulates costimulatory molecule and type I IFN production by dendritic cells <sup>16,86</sup>	Tetra-acyl lipid A <sup>80</sup>	Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles co-encapsulating tumour-associated protein antigen and tetra-acyl lipid A <sup>80</sup>	Increased the number of IFN- $\gamma$ -producing antigen-specific CD8 <sup>+</sup> T cells; induced production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-2 and IL-6) at the tumour site <sup>80</sup>
TLR5	Flagellin	Induces strong IgM and IgG responses <sup>87</sup>	Recombinant flagellin domains <sup>88</sup>	Poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles coated with flagella-enriched extract <sup>89</sup>	Not determined
TLR7	Single-stranded RNA	Induces IFN- $\alpha$ , IL-12 and TNF- $\alpha$ ; recruits dendritic cells and cytotoxic T cells; increases T-cell activation by APCs <sup>90</sup>	Imiquimod <sup>91</sup>	Imiquimod administered immediately after delivery of plasmid DNA coated onto 2- $\mu$ m-diameter gold particles <sup>91</sup>	Increased the number of mature dendritic cells in draining lymph nodes; enhanced antigen-specific CD4 <sup>+</sup> and CD8 <sup>+</sup> T-cell responses, biased towards a predominance of T <sub>H</sub> 1 cells <sup>91</sup>
TLR9	Unmethylated bacterial DNA	Activates immune cells and cytokine production for strong T <sub>H</sub> 1-type responses <sup>92</sup>	CpG oligonucleotides <sup>79,92</sup>	Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres co-encapsulating protein antigen with CpG oligonucleotides <sup>79</sup>	Increased the number of IFN- $\gamma$ -producing antigen-specific CD8 <sup>+</sup> T cells and the level of cytotoxicity; improved protection against vaccinia virus infection compared with separately administered antigen and adjuvant <sup>79</sup>

# PRRs e seus PAMPs

## NALPs

NALP3	Particulate matter such as asbestos, silica or alum	Induces pro-inflammatory cytokine (IL-1 $\beta$ ) <sup>93</sup>	Polymeric microparticles <sup>64</sup>	Biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) and polystyrene microparticles administered in conjunction with protein antigen <sup>64</sup>	Increased the secretion of IL-1 $\beta$ by dendritic cells; induced higher antibody titres; elicited IL-6 production by T cells; recruited and activated CD11b <sup>+</sup> Gr1 <sup>-</sup> cells <i>in vivo</i> <sup>64</sup>
-------	---	---	--	--	---

## Complement-associated

C3	Carbohydrates and bacterial proteins	Induces pathogen clearance by opsonization of pathogens <sup>94</sup>	Polymeric materials containing nucleophiles <sup>28</sup>	Complement-activating, nucleophile-containing polymeric nanoparticles <sup>28</sup>	Induced antigen-specific monoclonal antibody; induced IFN- $\gamma$ -producing antigen-specific CD8 <sup>+</sup> T cells <sup>28</sup>
			Recombinant C3d <sup>72,95</sup>	Recombinant, trimeric C3d protein conjugated to protein antigen through an avidin bridge <sup>18</sup>	Induced a more robust and protective response to antigen when administered with IFA than when protein antigen administered in IFA or with alum <sup>18</sup>
				Recombinant, trimeric C3d-antigen fusion DNA vaccine <sup>95</sup>	Generated higher-binding, early-appearing and neutralizing antibody responses; increased the number of IFN- $\gamma$ -producing antigen-specific CD8 <sup>+</sup> T cells <sup>95</sup>

The responses shown are related to engineering approaches to triggering these pathways or types of immunity using biomaterials. The table is not comprehensive but highlights a few recent biomaterials-based strategies for immunotherapeutic applications. C3, complement component 3; IFA, incomplete Freund's adjuvant; NALP3, NACHT domain-, leucine-rich repeat- and PYD-containing protein 3; poly(I:C), polyinosinic acid/polycytidylic acid.

# Exemplos de Adjuvantes

Table 1

Selective list of different classes of adjuvants which have been evaluated for enhancing immune responses to vaccines in animals

Mineral salts	Aluminium hydroxide, aluminium phosphate, calcium phosphate
Immunostimulatory adjuvants	Cytokines, e.g. IL-2, IL-12, GM-CSF, saponins, (e.g. QS21), MDP derivatives, bacterial DNA (CpG oligos), LPS, MPL and synthetic derivatives, lipopeptides
Lipid particles	Emulsions, e.g. Freund's (CFA and IFA), ISA 25, 51, 206, SAF, MF59, liposomes, virosomes, ISCOMS, cochleates
Particulate adjuvants	PLG microparticles, poloxamer particles, virus-like particles
Mucosal adjuvants	Heat-labile enterotoxin (LT), cholera toxin (CT), mutant toxins, e.g. LTK63 and LTR72, microparticles, polymerised liposomes, chitosan

*M. Singh, D.T. O'Hagan / International Journal for Parasitology 33 (2003) 469–478*

# Exemplos de Adjuvantes

1. Sais de alumínio
2. Adjuvantes de Freund
3. Microesferas
4. Lipossomas
5. Saponina
6. Complexos imune estimulatórios –ISCOMS
7. LPS – Monofosforil lipídeo A
8. Sequências CpG
9. Adjuvantes de mucosa

# Sais de alumínio

Mais utilizado em vacinas de uso humano e veterinário

Conhecido como adjuvante a mais de 80 anos

Hidróxido de alumínio

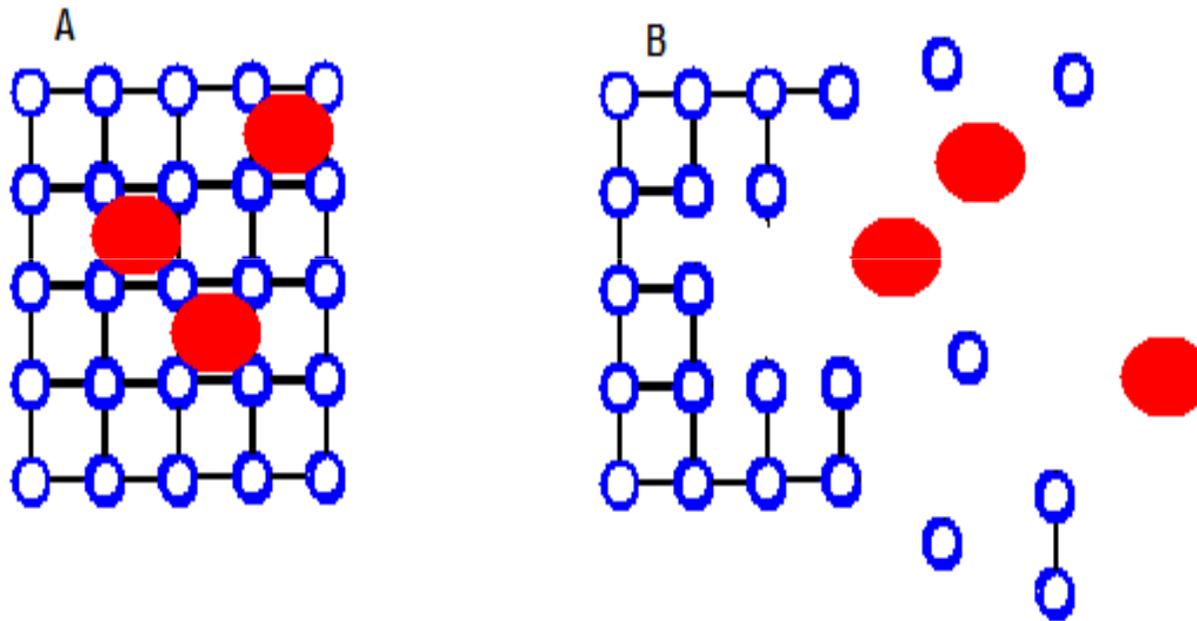
Mecanismo de ação:  
- Depósito;  
- Alvo para APCs;  
- Ativação sistema imune

Reações locais

(eritema, nódulos subcutâneos e hipersensibilidade de contato (PERRIE et al., 2008)).

Resposta Th2

# Hidróxido e Fosfato de Alumínio (Alum)



A. Alumínio liga-se a proteína (depósito)

B. A medida que esse complexo se dissolve, vai liberando Ag

# Adjuvante de Freund



Emulsão água em óleo mineral

Pode conter micobactérias mortas (CFA)  
ou não (IFA)

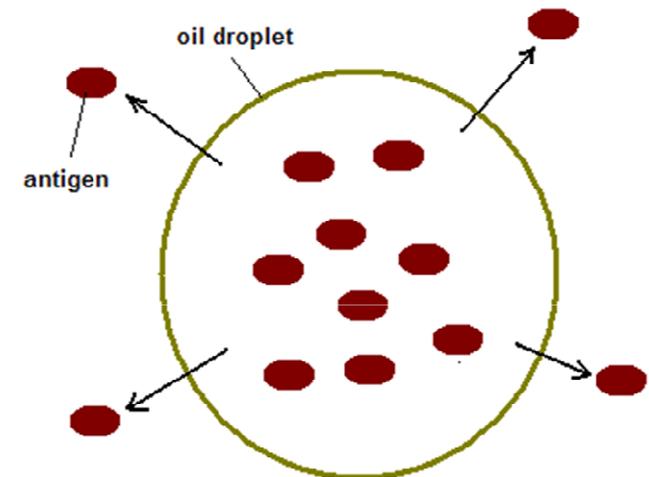
Não utilizada em humanos devido ao  
risco de inflamação grave

# Adjuvante de Freund

Ag se difunde lentamente à partir da gota de óleo

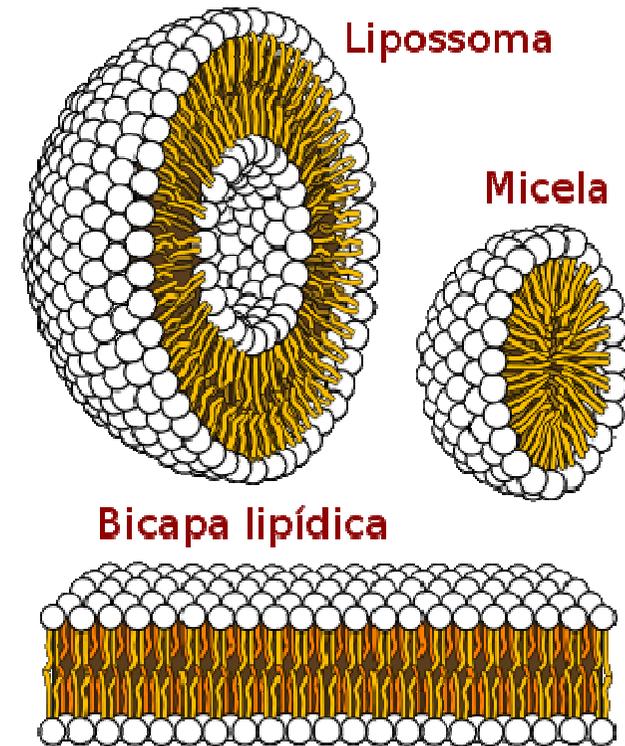
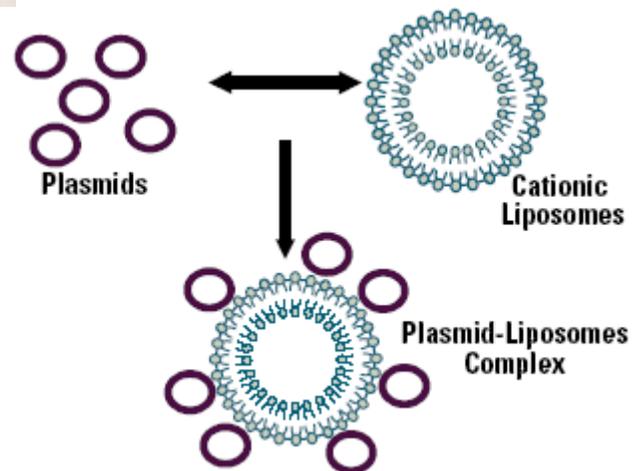
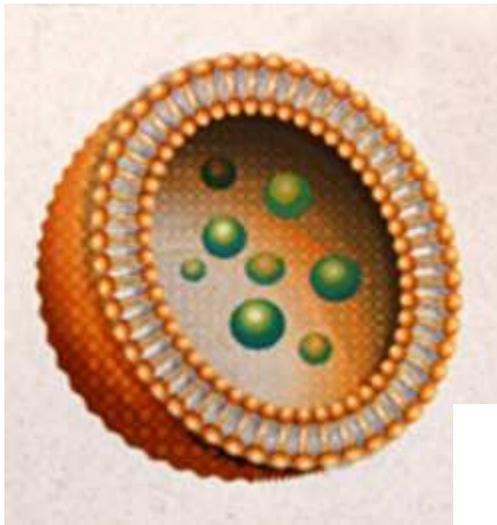
Ag bacterianos são adicionados com a finalidade de reforçar resposta imune

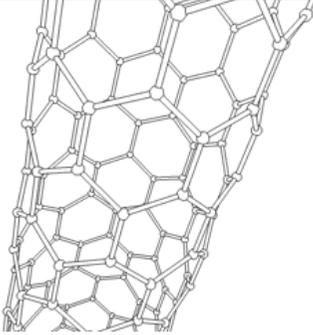
Deve ser aplicado SC ou intraperitoneal  
– IM provoca lesão temporária ou permanente do músculo



# Lipossomas

- Vesículas de fosfolipídeos e colesterol
- Depósito – Liberação gradual





# Microesferas

Sistemas de entrega de antígenos e/ou adjuvantes (CpG)

1º. Candidato – PLGA (ácido poliláctico-co-glicólico)

Poliéster biodegradável e biocompatível

Fios de sutura e sist. liberação drogas (aprovado FDA)

> Uptake CAA → Indução células T

# PLGA

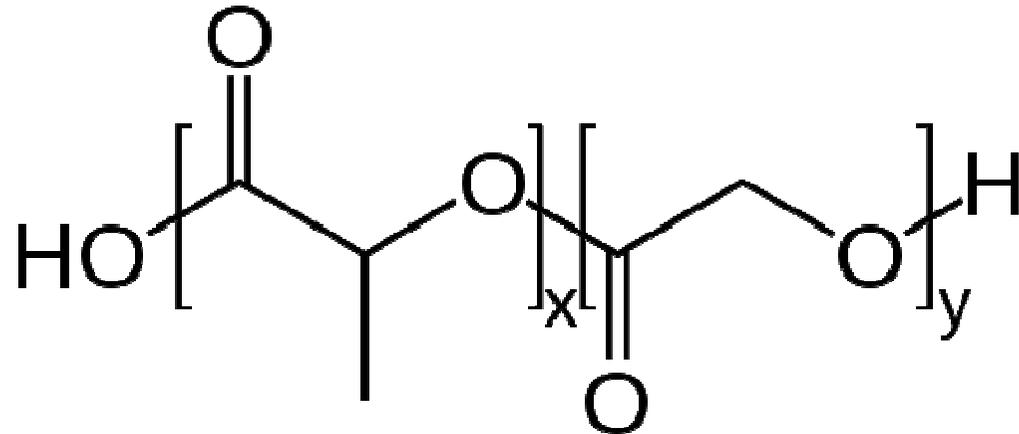


Table 2

Levels of enhancement of antibody responses achieved with cationic PLG/DNA microparticles in comparison to naked DNA (HIV-1 gag) following two intramuscular immunisations 4 weeks apart in various animal models

Species	DNA dose ( $\mu\text{g}$ )			Fold increase over naked DNA
		Naked DNA	PLG/CTAB/DNA	
Mice	1	22	7,664	>300
Guinea pigs	100	868	12,882	>15
Rabbits	250	644	8,778	>12
Rhesus macaques	500	19	10,220	>2000

*M. Singh, D.T. O'Hagan / International Journal for Parasitology 33 (2003) 469–478*

Um exemplo, de uma droga comercialmente disponível veiculada com PLGA é Lupron Depot<sup>®</sup> para o tratamento de câncer de próstata.

# Sequências CpGs

Efeito imunoestimulatório devido a presença de ODN CpG não metilado

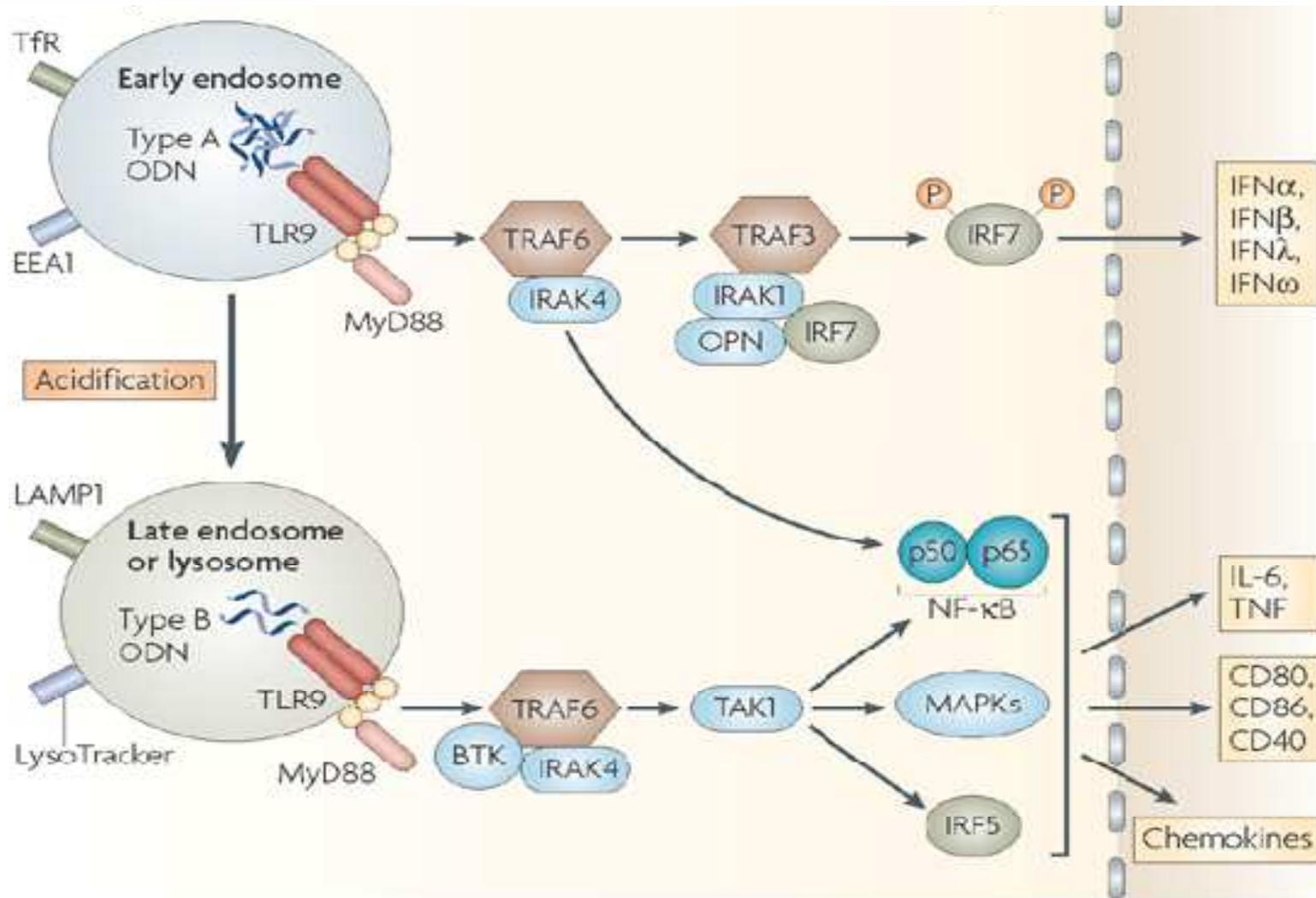
- Pouco presente e metilado no DNA de vertebrados

Ligação ao TLR-9 da membrana do endossomo

- Resposta Th1



# CpGs Vias de ativação



# LPS

- Componente da parede celular de bactérias Gram negativas
- Liberado na morte celular
- Ativa liberação de citocinas e mol. co-estimulatórias → **MICROBICIDA**

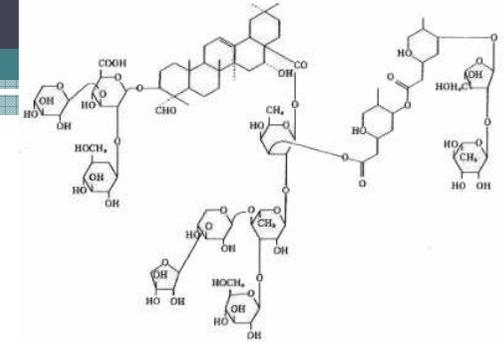
## Monofosforil lipídeo A (MPL)

- Derivado do LPS de *Salmonella minnesota* (TLR4)

## Resposta Th1

- Síntese e liberação de IL-2 e IFN- $\gamma$

# Saponinas



Glicosídeos triterpenóides

- Derivados de *Quillaja saponaria* (Quil A)

QS21 induz citocinas Th1

- IL-2 e IFN- $\gamma$  e Ac IgG2a

Interage com colesterol da membrana formando poros

- Entrada de antígeno na APC??

# ISCOMS

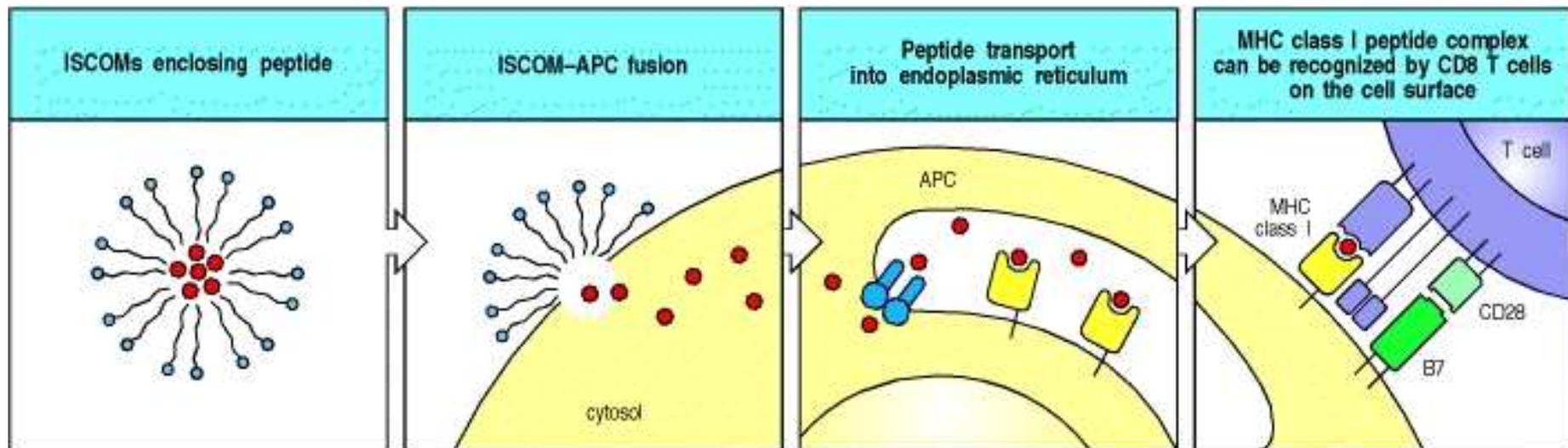
Consiste de partículas de colesterol e fosfolipídeos com a Quil A incorporada

Permite redução da dose de Quil A (Hemolítica)

Quil A é ligada ao colesterol diminuindo ligação a membrana celular

Chave para efeito adjuvante parece ser produção de IL-12 e IFN- $\gamma$

# ISCOMS



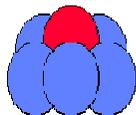
# Adjuvantes para imunização de mucosa

+ potentes → toxinas bacterianas

CT- toxina colérica (*Vibrio cholerae*)

LT – Enterotoxina termolábil (*Escherichia coli*)

Subunidad A



Subunidad B

# Adjuvantes para imunização de mucosa

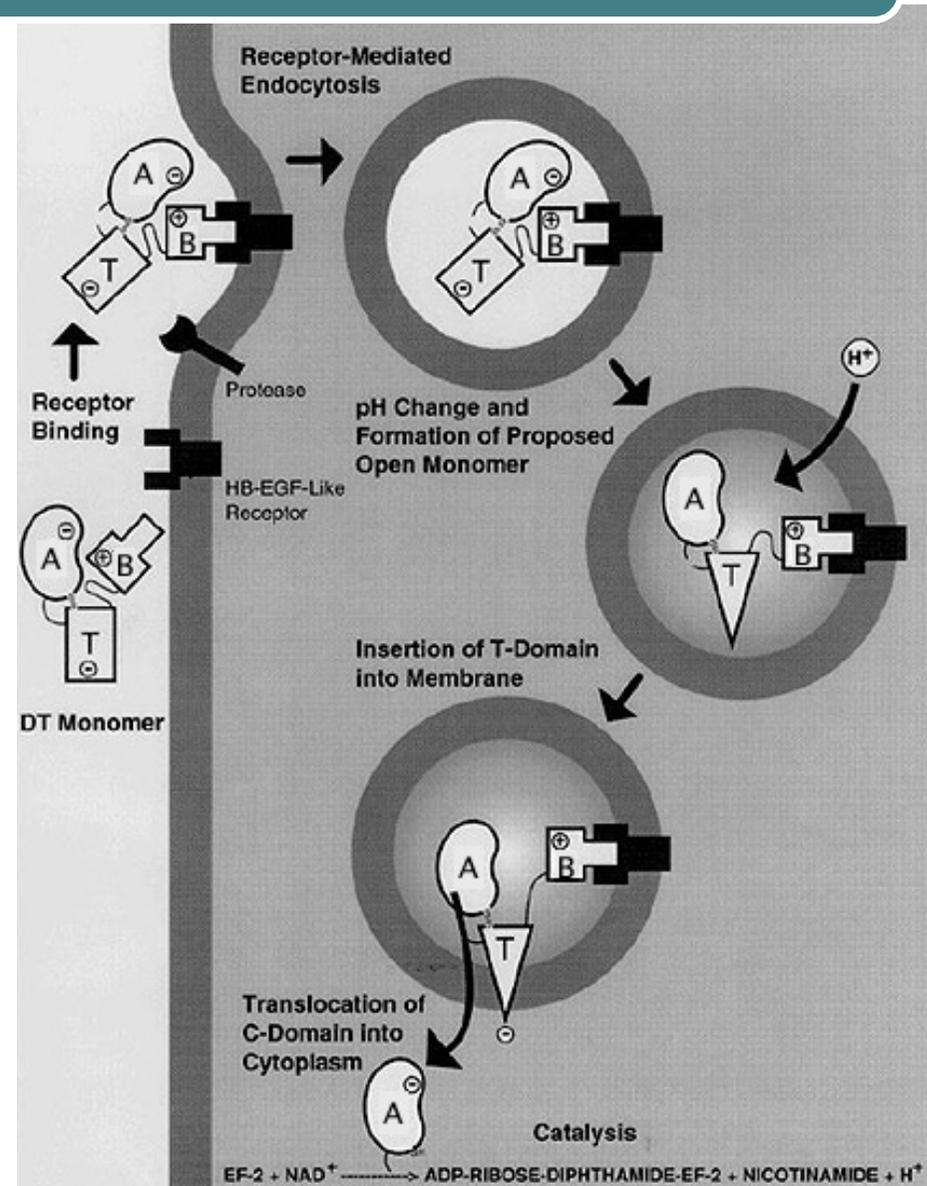
- **Problema:**

**TOXICIDADE**

- **Alternativa:**

**Uso exclusivo subunidade B**

**Mutação subunidade A**



# Adjuvantes aprovados para uso humano

Adjuvante	Descrição	Vacinas aprovadas
Aluminium-based mineral salts (Alum)	E.g. Aluminium phosphate, Calcium phosphate, Aluminium hydroxide	Eg. Anthrax (BioThrax®, Emergent Biosolutions) Hepatitis A (Vaqta®, Merck) DTP (Triple Antigen™, CSL limited)
MF59	Submicron oil-in-water emulsion	Influenza (FLUAD®, Novartis)
Monophosphoryl lipid A (MPL)	Bacteria-derived immunostimulant	Hepatitis B (Fendrix®, GlaxoSmithKline)
Virosomes	Spherical vesicles containing viral membrane proteins in the lipid membrane	Hepatitis A (Epaxal®, Berna Biotech) Influenza (Inflexal®, Berna Biotech)

# Vias de administração

- **Administração parenteral.**
  - Intramuscular, subcutânea, intravenosa.
- **Administração oral**
  - Usualmente na forma líquida.
  - Alimentos, por bioengenharia podem produzir vacinas.
- **Administração intranasal.**

# Rotas de infecção

Vias de administração mais comum



IM e SC

Routes of infection for pathogens			
Route of entry	Mode of transmission	Pathogen	Disease
<b>Mucosal surfaces</b>			
Airway	Inhaled droplet	Influenza virus	Influenza
	Spores	<i>Neisseria meningitidis</i>	Meningococcal meningitis
		<i>Bacillus anthracis</i>	Inhalation anthrax
Gastrointestinal tract	Contaminated water or food	<i>Salmonella typhi</i>	Typhoid fever
		Rotavirus	Diarrhea
Reproductive tract	Physical contact	<i>Treponema pallidum</i>	Syphilis
		HIV	AIDS
<b>External epithelia</b>			
External surface	Physical contact	<i>Trichophyton</i>	Athlete's foot
Wounds and abrasions	Minor skin abrasions	<i>Bacillus anthracis</i>	Cutaneous anthrax
	Puncture wounds	<i>Clostridium tetani</i>	Tetanus
	Handling infected animals	<i>Francisella tularensis</i>	Tularemia
Insect bites	Mosquito bites ( <i>Aedes aegypti</i> )	Flavivirus	Yellow fever
	Deer tick bites	<i>Borrelia burgdorferi</i>	Lyme disease
	Mosquito bites ( <i>Anopheles</i> )	<i>Plasmodium</i> spp.	Malaria

Figure 2-2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

# Administração mucosa



# Administração mucosa

- Mais atrativa → V.O.
- Entretanto apresenta problemas:

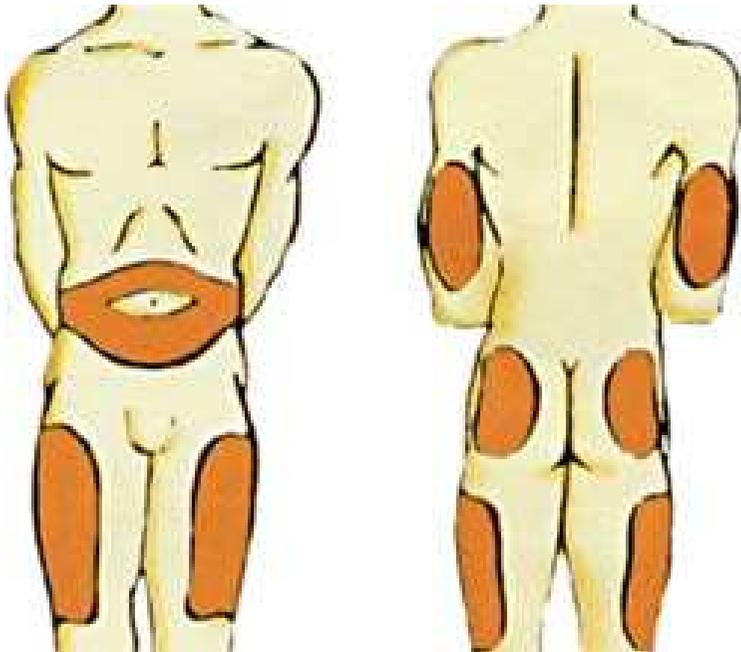
Acidez estomacal  
Enzimas digestivas  
Anergia



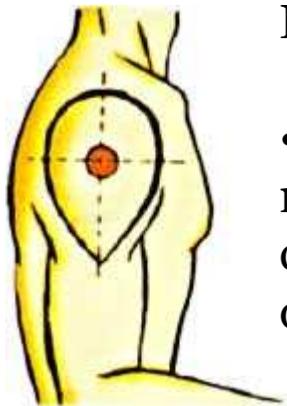
# Via Subcutânea



- No tecido subcutâneo, entre a pele e o músculo usado para medicamentos que devem ser absorvidos lentamente

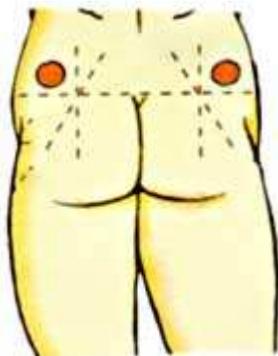


# Via Intramuscular



## Região Deltoideana

- Contra-indicado para menores de 10 anos e adultos com pequeno desenvolvimento muscular.

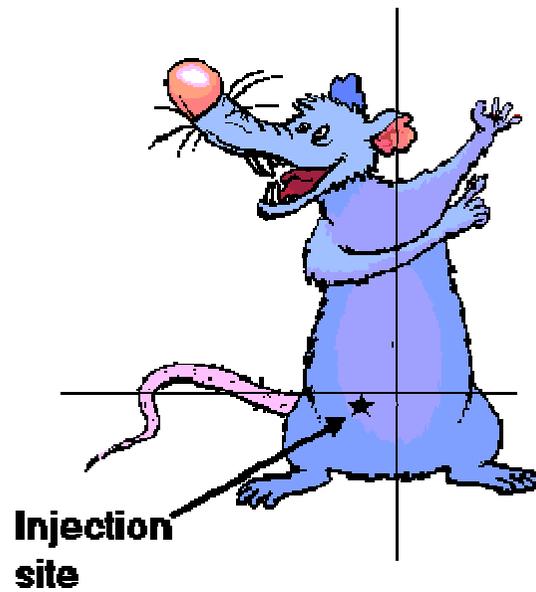


## Região Ventro-Glútea

- Local de baixo risco.



# Via Intraperitoneal

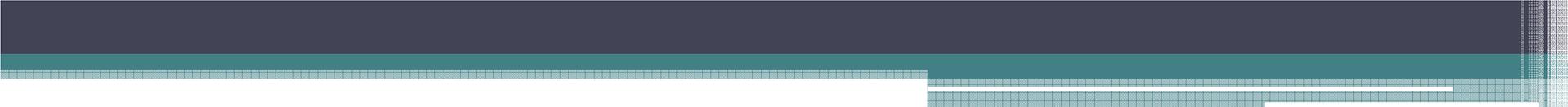


## Estudo de caso

- O dramático aumento e prevalência da infecção por Herpes simplex virus (HSV), gerou a necessidade do desenvolvimento de uma vacina efetiva. Diversas estratégias já foram adotadas como a autoinoculação de HSV vivo, vacinas inativadas, vacinas atenuadas, vacinas de vírus vivos modificados, vacinas de subunidade recombinantes (glicoproteínas) e vacinas de DNA. Na maioria desses estudos, a despeito da indução de altos níveis de anticorpos neutralizantes, não houve proteção. O mais promissor resultado foi obtido com a glicoproteína HSV-2 gD administrada com alumínio e MPL.

## Diante disso...

1. Que tipo de resposta imune provavelmente seja protetora?
2. Os adjuvantes administrados são pertinentes com esse tipo de resposta?
3. Que outros adjuvantes poderiam ser testados antes de se descartar o alvo?



Obrigada pela atenção!!

[katialbacelo@gmail.com](mailto:katialbacelo@gmail.com)