

## Protección inducida por nanococleatos derivados de proteoliposomas de *Leptospira interrogans* serovar Canicola

Beatriz Tamargo,<sup>1\*</sup> Luis Alfredo Rosario,<sup>1</sup> Niurka Batista,<sup>2</sup> Daniel Francisco Arencibia,<sup>2</sup> Kenia Fernández,<sup>2</sup> Aileen Villegas,<sup>2</sup> Juan Alfonso Ayala,<sup>3</sup> Victoriano Gustavo Sierra<sup>2\*\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos (IFAL, UH). Calle 222 e/ 23 y 27. La Coronela, municipio La Lisa, La Habana, Cuba. CP: 13600.

<sup>2</sup>Instituto Finlay. Centro de Investigación y Producción de Vacunas. Ave. 27 No. 19805, municipio La Lisa, La Habana, Cuba. CP: 16011.

<sup>3</sup>Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Universidad Autónoma de Madrid. Carretera Nicolás Cabrera 1. Cantoblanco (Campus UAM) 28049. Madrid, España.

**email:** gsierra@finlay.edu.cu; gustavosierra6352@yahoo.com

Desde los años 20 del pasado siglo, hasta el presente, en el mundo se han desarrollado y empleado vacunas de células enteras contra la leptospirosis que confieren una corta inmunidad; la mayoría no adyuvadas y dirigidas, fundamentalmente, contra los diferentes serogrupos de la especie *Leptospira interrogans*, contenidos en las preparaciones. Numerosos han sido los intentos realizados para lograr una formulación vacunal más pura, efectiva, de amplio espectro y duración de la protección que las bacterinas de células enteras inactivadas. Sin embargo, hasta el momento no se ha registrado ninguna vacuna con tales características. En el presente trabajo se obtuvieron antígenos de membrana externa a partir de una cepa cubana autóctona (Cepa 87, *L. interrogans* serovar Canicola), mediante una modificación de la tecnología para la producción de vesículas de membrana, patentada por investigadores del Instituto Finlay. Estos antígenos con estructura nanoproteoliposómica fueron formulados/adyuvados mediante diferentes estrategias, logrando cinco preparaciones con estructura coclear, que constituyen nanopartículas de aproximadamente 100 a 150 nm de largo y entre 15 a 30 nm de diámetro. Los inmunógenos se inocularon en el biomodelo *Mesocricetus aureatus*, con dos dosis e intervalo de seis semanas. El reto fue realizado con 100.000 DL<sub>50</sub>. Los resultados demuestran que las nuevas formulaciones vacunales confieren protección frente al reto homólogo y fueron capaces de eliminar el estado de portador, lo que unido a la robustez del método de preparación, el mayor nivel de pureza, en comparación con las bacterinas, y la no necesidad del hidróxido de aluminio, las convierten en una alternativa de interés para continuar su desarrollo.

**Palabras clave:** *Leptospira interrogans*, nanoproteoliposoma, nanococleatos, vacuna.

### Introducción

La leptospirosis es una de las zoonosis bacterianas más difundidas y desatendidas en el mundo. El agente causal de esta patología pertenece al orden spiroquetales, familia Leptospiraceae. Son bacterias delgadas y helicoidales, las cuales se agrupan en cuatro especies saprofitas y 12 patógenas (1). Está bien documentado que el desarrollo de una respuesta inmune humoral durante la leptospirosis es importante para la resistencia a la infección. Dicha inmunidad parece depender de la producción de anticuerpos aglutinantes y opsonicos, ambos dirigidos contra determinantes antígenicos serovar o serogrupos específicos (2).

La inmunidad pasiva puede ser conferida solamente por anticuerpos, aunque se reconoce también el papel de la respuesta inmune mediada por células (3). Entre los antígenos protectores se han descrito los lipopolisacáridos

(LPS), proteínas con dominios transmembránicos, lipoproteínas y proteínas periféricas (4).

La mayoría de las vacunas antileptospirósicas disponibles o en desarrollo avanzado están compuestas por células enteras inactivadas, con o sin adyuvante, excepto una vacuna china de proteínas de membrana externa que incluye las proteínas de dos serovares de importancia epidemiológica.

Las vacunas de células enteras incluyen en sus formulaciones los serovares de mayor circulación en la región seleccionada para su aplicación (2). Las tecnologías de obtención de estas vacunas a lo largo de los últimos años se han modificado. Las primeras vacunas, compuestas por suspensiones de leptospirosis inactivadas y cultivadas en medio con suero ocasionaron efectos indeseables tras su aplicación. Las vacunas modernas, preparadas con un medio libre de proteínas, tienen menor cantidad de efectos adversos (3).

\* Lic. Ciencias Farmacéuticas, Máster en Ciencias, Profesor Auxiliar; Jefe de Cátedra de Inmunología, Microbiología y Biotecnología Farmacéutica del Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana.

\*\* Autor de correspondencia: Dr. en Ciencias Médicas, Médico Especialista en Inmunología y Académico Titular.

La inmunización con estas vacunas protege solo contra la enfermedad causada por serovares homólogos o serovares antigénicamente similares. Todo lo anterior indica que las mismas deben contener los serogrupos que circulan con mayor incidencia en la población que será inmunizada, lo que demuestra que aún no se ha logrado evadir totalmente el problema de la inmunogenicidad serogrupo/serovar específica planteado para este microorganismo (5).

En la actualidad muy pocos países aplican vacunas antileptospirosis de uso humano, muchas de las cuales provocan reacciones de hipersensibilidad, corta duración de la protección y ausente o insuficiente inmunoprotección cruzada contra los serovares no incluidos en la formulación evaluada (6).

En Cuba, en el Instituto Finlay, se produce a escala industrial, con instalaciones y equipamiento validados, cumpliendo las Buenas Prácticas de Producción, una vacuna antileptospirosis trivalente de células enteras para uso humano, la cual se comercializa bajo el nombre de vax-SPIRAL®, que consiste en una bacterina de células enteras, adyuvada con hidróxido de aluminio, efectiva contra *L. Canicola*, *L. Copenhageni* y *L. Mozdok*.

Esta vacuna por su formulación induce una mayor duración de la protección que otras bacterinas y confiere protección parcial contra serogrupos no incluidos en su formulación, como *L. Ballum* y otros; tiene un buen perfil de seguridad y ha tenido un impacto positivo contra la leptospirosis en Cuba y en otros países (5, 7).

Debido a las afecciones que produce la leptospirosis en el hombre y en los animales, así como por las desventajas que presentan las vacunas de células enteras, varios grupos de investigación se han centrado en el desarrollo de productos vacunales más novedosos, efectivos y seguros.

En las últimas décadas, los estudios en vacunas contra esta enfermedad se han enfocado en el desarrollo de candidatos basados en lipopolisacáridos, lipoproteínas, proteínas de membrana externa y en los factores de virulencia potenciales (4, 8).

El propósito fundamental de estas preparaciones ha sido eliminar los inconvenientes que suponen el uso de las vacunas de células enteras inactivadas. Sin embargo, aunque mucho se ha avanzado, todavía no se vislumbra a corto plazo ningún resultado definitivo para el desarrollo de las mismas.

Nuestro grupo de trabajo tiene como objetivo desarrollar un nuevo candidato vacunal acelular, empleando novedosas formulaciones adyuvantes de estructura coclear, con el propósito de eliminar el hidróxido de aluminio, así como obtener una vacuna no solo de mayor pureza y de larga memoria inmunológica, sino también de amplio espectro protector contra los serovares patógenos.

Con el presente trabajo damos a conocer los resultados referentes a la protección homóloga y a la identificación microscópica, tanto del antígeno como de las formulaciones.

## Materiales y Métodos

### Cepas y condiciones de cultivo

Se seleccionó la cepa (Cepa 87, *L. interrogans* serovar Canicola) para la obtención del extracto de membrana externa y, además, como cepa de reto para demostrar la capacidad protectora homóloga de las diferentes formulaciones. La misma pertenece al género *Leptospira*, especie fenotípica *interrogans* serovar Canicola. Su virulencia se mantuvo a través de pases periódicos en hámsteres, según los métodos descritos (9). Se conservó en medio semisólido Fletcher y se subcultivó mediante pases semanales en el medio proteico EMJH, bajo condiciones estáticas, a una temperatura de mantenimiento entre 28-30 °C.

El preinóculo para el fermentador de 35 L Chemap AG se obtuvo a partir de tres cultivos en zaranda, con volúmenes crecientes, en medio ME, con agitación y temperatura entre 28-30 °C. A partir de este cultivo se obtuvo el inóculo del fermentador de 150 L Chemap AG, en el cual se realizó la fermentación en medio libre de proteínas entre 28-30 °C y agitación por aire sumergido. El cultivo se inactivó con formaldehído al 0,05%; las células se lavaron con los tampones adecuados para la extracción de los componentes de membrana y se concentraron mediante filtración tangencial en un equipo Sartocoon Mini (Sartorius). Todas las operaciones de esta investigación se realizaron empleando personal calificado e instalaciones y equipos validados, siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio y de Producción (BPP) (10).

### Extracción de componentes de la membrana externa

La extracción y purificación de los componentes de la membrana externa se realizó según la tecnología proteoliposómica, propiedad del Instituto Finlay, desarrollada por Campa y cols. (11), modificada para el presente trabajo. El extracto final fue filtrado con filtros de 0,2 µm de diámetro y almacenado en bulbos estériles sellados a 4 °C, hasta ser empleado para elaborar las formulaciones vacunales experimentales.

### Formulaciones vacunales

Las formulaciones adyuvantes vacunales (patente en proceso) se elaboraron empleando como antígenos los componentes de membrana externa de *L. interrogans* serovar Canicola (CME-L.C). Estos se combinaron con sustancias naturales o sintéticas con propiedades inmunomoduladoras, para producir cinco grupos de formulaciones experimentales, denominadas AIF-L.C: 1, 2, 3, 4 y 5, (AIF-L.C: adyuvantes IFAL-Finlay, *L. interrogans* serovar Canicola). Para la

elaboración de los adyuvantes se produjeron liposomas a partir de una mezcla de dioleoilfosfatidilserina (DOPS) y colesterol (Sigma Aldrich Co.), para lo cual se usó una modificación del procedimiento de deshidratación-rehidratación, descrito por Kirby y Gregoriadis (12); a la suspensión de liposomas preformados se le adicionó cloruro de calcio (0,1 M) para obtener los cocleatos (13).

Los cocleatos de la formulación AIF- L.C 1, a diferencia del resto, se formaron solo con los componentes de membrana, extraídos de la bacteria. Las formulaciones AIF-L.C: 2, 3, 4 y 5 se diferencian en cuanto al uso de una u otra sustancia inmunomoduladora, procedentes de membranas bacterianas, derivadas de plantas y sintéticos que contienen los CME-L.C. Todos ellos en fase de patente. Como vehículo para los cocleatos se empleó el tampón TES (2 mM de Tris, 150 mM de NaCl, detergente,  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) y como preservativo tiomersal al 0,005%. Las preparaciones se almacenaron a 4 °C, protegidas de la luz.

En el experimento se utilizó como control positivo una formulación de células enteras inactivadas del serovar Canicola (Bacterina Canicola), la que se produjo según la tecnología descrita para vax-SPIRAL® (5).

### Microscopia electrónica de transmisión

Después de la adsorción de 5  $\mu\text{L}$  de las CME-L.C y de cada una de las formulaciones adyuvantes sobre rejillas de cobre, las muestras se procesaron por tinción negativa, con acetato de uranilo al 2%, según el método clásico de la gota y se observaron en un microscopio JEM1010Jeol.

### Animales de experimentación

Se utilizó el biomodelo *Mesocricetus aureatus* (Hámster Sirio Dorado), animales hembras con un peso corporal entre 45-60 g, procedentes del Centro para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB, Mayabeque, Cuba). Los animales de mantuvieron bajo régimen de humedad y temperatura controlada, teniendo en cuenta para cada uno de los ensayos las normas y regulaciones bioéticas vigentes, tanto nacionales como internacionales (14).

### Inmunización

En todos los casos se utilizó el esquema de inmunización recomendado por González y cols. (5). Dos dosis de 50  $\mu\text{g}$  (referida a la concentración de proteínas), cada una en 0,5 mL, por vía subcutánea (SC) en la región dorso lateral del lomo de todos los animales y por vía intramuscular (IM) en la cara interna de cada extremidad posterior (en un volumen de 0,25 mL en cada miembro) y separadas por un intervalo de seis semanas.

Se inmunizaron 12 grupos de 8 animales cada uno, con una u otra preparación vacunal, por ambas vías de administración. Además, 10 animales se inocularon con el placebo,

consistente en tampón fosfato salino (TFS), y como grupo control positivo, 8 animales se inmunizaron con la Bacterina Canicola.

### Evaluación de la capacidad protectora y verificación de la eliminación del estado de portador

La capacidad de protección homóloga de las preparaciones vacunales experimentales se determinó a los 21 días posteriores a la terminación del esquema de inmunización, mediante la cuantificación de los animales sobrevivientes, después de ser inmunizados y retados con la cepa virulenta. El reto se realizó con 100.000 dosis letal media ( $\text{DL}_{50}$ ) de *L. interrogans* serovar Canicola. La determinación de la  $\text{DL}_{50}$  se realizó mediante el método de Reed y Muench, como se describe en González y cols. (5). Los animales se observaron durante los 21 días posteriores al reto, con el propósito de cuantificar el número de sobrevivientes en cada grupo.

Para determinar la presencia de leptospiras en los principales órganos dianas (hígado y riñón) se tomaron muestras de los animales que sobrevivieron al reto, al día 21 después del desafío. Para el aislamiento las muestras fueron sembradas en medio líquido EMJH e incubadas a 28-30 °C durante 60 días, y se evaluó periódicamente el crecimiento mediante la observación al microscopio de campo oscuro.

### Análisis estadístico

Para el procesamiento estadístico se utilizó el programa STATISTICA 6.0. El análisis de los resultados obtenidos en los experimentos de protección se realizó mediante la comparación de proporciones (tabla de contingencia) según la prueba exacta de Fisher. Todos los valores de  $p$  fueron de doble cola, considerándose un valor menor que 0,05 para indicar la significación estadística.

### Resultados y Discusión

Las condiciones establecidas en el proceso de cultivo de la cepa *L. interrogans* serovar Canicola seleccionada están validadas en términos de instalaciones, equipos y calificación del personal, cumpliendo con todos los requisitos de BPP. Las condiciones de cultivo establecidas para el preinóculo del fermentador de 35 L Chemap AG y para el escalado en el fermentador de 150 L Chemap AG fueron adecuadas, por lo que se logró en el primero una D.O media de 0,671 en 48 h, y para el segundo de 0,723 en 72 h, con buena vitalidad del cultivo. Esto permitió obtener una biomasa celular con un rendimiento satisfactorio, útil para ser sometida al proceso de extracción, con el empleo de detergentes y demás operaciones de purificación.

El procedimiento empleado para la extracción y purificación de los componentes de la membrana externa de *Leptospira* permite separar componentes lipídicos y proteicos de la bacteria, en las proporciones y condiciones físico/químicas

adecuadas. Estas posibilitan su autoorganización en forma de vesículas de membrana externa o proteoliposomas, que en este caso por sus dimensiones, entre los 15 y 50 nm, son nanopartículas, lo que se evidenció en las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (MET), a partir de muestras de los extractos de membrana purificados (Fig. 1). Las modificaciones realizadas a la tecnología desarrollada por Campa y cols. (11) adaptándola a los requerimientos de este microorganismo, permitieron obtener nanoproteoliposomas de tamaño notablemente uniforme, muy adecuados para su transformación en cocleatos.

Se ha demostrado la importancia de la estructura proteoliposómica como forma de presentación al sistema inmune de los antígenos seleccionados y purificados, además del papel inmunopotenciador de los LPS y de ciertas proteínas de membrana externa, como las porinas (4).

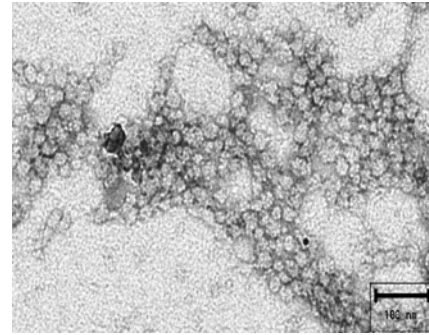
En Cuba se investigó, desarrolló, produjo y aplicó exitosamente la primera vacuna basada en una estructura proteoliposómica de sus antígenos principales, VA-MENGOC-BC® (11). Recientemente, aplicando esta plataforma tecnológica proteoliposómica, se trabaja en la obtención de nuevos productos vacunales contra el cólera y otros patógenos (16).

Los proteoliposomas y los cocleatos obtenidos a partir de los mismos se han empleado como sistemas de presentación de antígenos en vacunas por subunidades y como adyuvantes, convirtiéndolos en importantes candidatos para la investigación y el desarrollo de nuevas vacunas.

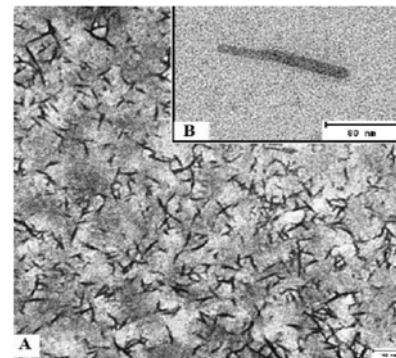
En las formulaciones experimentales AIF-L.C: 1, 2, 3, 4 y 5 se aprecia por MET la formación de un gran número de partículas alargadas y enrolladas, similares a cigarrillos, cuya morfología se corresponde con los cocleatos formados después de la adición de cationes divalentes a pequeños liposomas multilaminares (13).

En este trabajo las partículas cocleares tienen un tamaño aproximado entre 100 y 150 nm de largo y entre 15 y 30 nm de diámetro, lo que confirma su naturaleza nanococlear (Fig. 2). Estas proporciones favorecen su captura por las células presentadoras de antígenos, convirtiéndolas en sistemas de entrega y presentación muy apropiados para ser usados en vacunas sistémicas y mucosales.

En el Instituto Finlay, Cuba, se han desarrollado también formulaciones de cocleatos (Ch) a partir de las vesículas de membrana externa (VME) o proteoliposomas (PL) de *Neisseria meningitidis* B (NMB). Valiéndose de la experiencia acumulada en el empleo del PL como adyuvante o sistema de liberación, Oliver Pérez y cols. transformaron el PL de NMB en Ch y lo han evaluado en formulaciones vacunales empleando diferentes antígenos como: proteínas de NMB, *Leishmania major*, proteína gD2 (herpes genital), antígenos de malaria, por solo citar algunos ejemplos (16).



**Fig. 1.** Microfotografía que muestra la formación de estructuras vesiculares, después de extraer los componentes de membrana de *L. interrogans* serovar Canicola. Se observan abundantes partículas esféricas o vesículas de membrana externa, de tamaño homogéneo, entre 15 y 50 nm (nanoproteoliposomas). Magnificación de 60 K. Microscopio JEM1010Jeol.



**Fig. 2.** MET. **A:** Microfotografías representativas que muestran la formación de múltiples cocleatos en AIF/c-5. Imágenes similares se obtuvieron para las formulaciones adyuvantes AIF/c: 1, 2, 3 y 4. Estas partículas tienen un largo aproximado entre 100 y 150 nm y entre 15 y 30 nm de diámetro. **A:** magnificación de 40 K. **B:** se observa la imagen aumentada de un cocleato. Magnificación de 60 K. Microscopio JEM1010Jeol.

Empleando una tecnología similar otros investigadores han obtenido Ch a partir de PL de diferentes bacterias como, por ejemplo, de *Vibrio cholerae* (16).

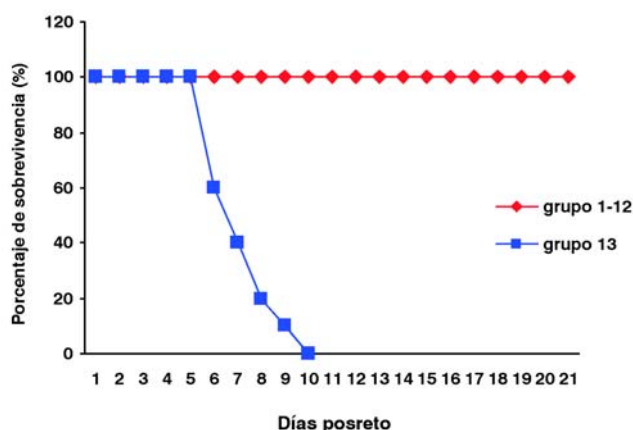
Sin embargo, respecto a *Leptospira*, aunque se han reportado varias estrategias de vacunas acelulares y se ha demostrado la capacidad inmunogénica y protectora tanto de proteínas de membranas, LPS, lipoproteínas, proteínas solubles y otros factores de virulencia, algunos recombinantes (2, 17-20), es en este trabajo donde se demuestra, por primera vez, la formación de proteoliposomas a partir de los CME de esta bacteria y su empleo como antígenos en la elaboración de cocleatos, mediante imágenes de MET, que al ser evaluados como candidatos en vacunas antileptospirósicas, sin usar el adyuvante hidróxido de aluminio, demostraron elevada capacidad protectora, frente al reto homólogo con 100.000 DL<sub>50</sub> de la cepa virulenta.

Según las normativas de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las vacunas contra la leptospirosis deben ser seguras y eficaces, siendo consideradas aceptables aquellas que son capaces de generar más de un 70% de protección contra el reto letal en los biomodelos recomendados y una completa eliminación del estado de portador en estos animales (5, 8).

Aún cuando en el hombre el estado de portador solo dura un corto periodo de tiempo tras la infección natural y usualmente no constituye una fuente importante de diseminación de la enfermedad, en animales, como el ganado vacuno o porcino, el estado de portador crónico asintomático puede extenderse durante años, constituyendo un problema epidemiológico (3).

Los resultados obtenidos en la evaluación de la protección generada por estos candidatos vacunales en hámster, retados con 100.000 DL<sub>50</sub> de la cepa vacunal homóloga (Fig. 3) muestran cómo los grupos inmunizados, tanto con las nuevas formulaciones (AIF-L.C: 1, 2, 3, 4 y 5), como con la formulación vacunal monovalente de células enteras inactivadas (Bacterina Canicola), fueron capaces de proteger en un 100% a los animales retados, resultados que difirieron significativamente con los placebos para una  $p=3,754 \times 10^{-12}$ . Debe destacarse que no se encontraron diferencias significativas ( $p \geq 0,05$ ) entre ninguna de las formulaciones vacunales ensayadas, para estas condiciones de reto.

En cambio, en los animales del grupo placebo la mortalidad fue del 100%, los signos y síntomas característicos de la enfermedad comenzaron a observarse entre los días cuarto al décimo, después de realizado el reto. En el resto de los grupos no se observó en ninguna de las fases del experimento signos o síntomas de la enfermedad leptospirósica, como hemorragias o ictericia (18).



**Fig. 3.** Protección contra la infección letal conferida en hámsteres por las formulaciones vacunales acelulares, monovalentes de *L. interrogans* serovar Canicola después del reto con 100.000 DL<sub>50</sub> de la cepa *L. interrogans* serovar Canicola a los 21 días del reto. Grupos del 1-11 recibieron las formulaciones AIF-L.C: 1-5, por vía IM y SC; el grupo 12 recibió la Bacterina Canicola por vía IM y el grupo 13 el placebo (tampón fosfato salino) por vía IM.

Por su parte, el cultivo de varias secciones de los órganos en medio proteico EMJH demostró que en todos los grupos de animales inmunizados hubo ausencia de crecimiento microbiano tras 60 días de incubación. De ahí que los resultados de protección alcanzados con las preparaciones vacunales estudiadas reafirmen la utilidad de la cepa seleccionada para la elaboración de las mismas.

Esta cepa es lo suficientemente virulenta como para lograr una mortalidad del 100% en animales no inmunizados, provocando la muerte de los animales en un plazo entre 5 y 10 días, lo que se corresponde con resultados obtenidos por otros investigadores (5,9). Además, la misma pertenece al serogrupo de mayor incidencia en Cuba y en varios países del continente americano (1).

Los resultados de protección contra el reto letal, obtenidos en este estudio a corto plazo, son similares a los que se alcanzan con la formulación de células enteras inactivadas y superiores a los logrados por otros grupos de trabajo que desarrollan candidatos vacunales, para conferir protección contra la leptospirosis a partir de subunidades proteicas. Los mismos, a pesar de utilizar proteínas altamente conservadas, la mayoría solo obtienen una protección homóloga parcial y no logran eliminar el estado de portador (20).

Es de destacar que así como lo logra vax-SPIRAL® y otros candidatos vacunales acelulares (18,19), las formulaciones AIF-L.C:1-5 eliminaron completamente el estado de portador.

Estos resultados están en concordancia con datos similares de otras vacunas antileptospirósicas adyuvadas, y resultan novedosos y diferentes a los obtenidos con candidatos vacunales de células enteras no adyuvadas y recombinantes (adyuvados o no). Variantes no adyuvadas de la vacuna cubana demostraron ser menos inmunogénicas y protectoras en modelos animales (8).

En este sentido es importante destacar que un gran número de los candidatos vacunales más actuales, generados fundamentalmente a partir de proteínas extracelulares, no han logrado establecer protección contra el estado de portador, aún cuando han protegido en alguna medida contra la infección letal (21). Estos resultados ratifican la teoría acerca de la importancia de la adyuvación para la erradicación del estado de portador.

Una vacuna con la potencialidad de eliminar el estado de portador es de mucha utilidad, aunque para el caso del hombre esto no tiene gran valor en la transmisión, sí sería de gran importancia para evitar lo que algunos autores llaman leptospirosis persistente, otras secuelas y algunas leptospirosis crónicas, estado del individuo que provoca posiblemente un número importante de casos con patologías que no se logran diagnosticar ni curar. Las preparaciones vacunales evaluadas en este trabajo han sido generadas con los principales componentes de la membrana externa de

*L. interrogans* serovar Canicola, extraídos mediante el tratamiento de la bacteria con detergentes y ensamblados en estructuras nanoproteoliposómicas; no contienen los ácidos nucleicos y otras impurezas que poseen las vacunas de células enteras; están adyuvadas en diferentes formulaciones cocleares de probada efectividad, estables y seguras y tienen la ventaja adicional de no utilizar el hidróxido de aluminio.

En nuestras condiciones, los resultados de sobrevivencia y eliminación del estado de portador contra el reto homólogo han sido satisfactorios, por lo que ya se iniciaron los ensayos para evaluar los mecanismos inmunológicos (humorales y celulares), así como la duración de la respuesta inmune protectora generados por estas nuevas preparaciones vacunales. Por otra parte, están en curso los ensayos para determinar la eficacia de las mismas contra el reto heterólogo con cepas virulentas de importancia epidemiológica, con la finalidad de disponer de una plataforma para el futuro desarrollo de vacunas acelulares contra la leptospirosis, tanto para humanos como para animales.

## Referencias

- OPS. Organización Panamericana de la Salud. 14ª Reunión Interamericana a nivel Ministerial en Salud y Agricultura. Las enfermedades desatendidas en las poblaciones postergadas, con énfasis en las zoonosis. 2005:14-8. Disponible en: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/vp/rimsa14-18-s.pdf>.
- Wang Z, Jin L, Węgrzyn A. Leptospirosis vaccines. *Microbial Cell Factories* 2007;6:39. Disponible en: <http://www.microbialcellfactories.com/content/6/1/39>.
- Adler B, De la Peña M. *Leptospira* and Leptospirosis. *Vet Microbiol* 2009;2:4382-92.
- Haake D, Matsunaga J. Characterization of the leptospiral outer membrane and description of three novel leptospiral membrane proteins. *Infect Immun* 2002;70:4936-45.
- González M, Martínez R, Cruz R, Infante J, González I, Baró M, et al. Vax-SPIRAL®. Vacuna antileptospirósica trivalente para uso humano, investigación, desarrollo e impacto sobre la enfermedad en Cuba. *Biotec Aplic* 2004;2(2):107-11.
- McBride A, Athanazio D, Reis M, Ko A. Leptospirosis. *Curr Opin Infect Dis* 2005;18:376-86.
- Martínez R, Pérez A, Quiñones M, Cruz R, Álvarez A, Armesto M, et al. Eficacia y seguridad de una vacuna contra la leptospirosis humana en Cuba. *Rev Panam Salud Pública* 2004;15:249-55.
- Yang C, Wu M, Pan M, Hsieh W, Vandewalle A, Huang CC. The *Leptospira* outer membrane protein LipL32 induces tubulointerstitial nephritis-mediated gene expression in mouse proximal tubule cells. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:2037-45.
- Silva E, Santo C, Athanazio D, Seyffert N, Seixas F, Cerqueira GM, et al. Characterization of virulent *Leptospira* isolates in hamster model. *Vaccine* 2008;36:56-62.
- European Commission. "Guide to Good Manufacturing Practice for Medicinal Products and Active Pharmaceutical Ingredients. Annex 13 Manufactures of Investigational Medicinal Products". Brussels: European Commission Enterprise Directorate General; 2003.
- Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Vázquez G, Jorrín LG, García L, et al, inventors. Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. US patent 5,597,572. 1997 Jan. 28.
- Kirby C, Gregoriadis G. Dehydration-Rehydration Vesicles: A Simple Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes. *Nature Biotechnology* 1984;2:979-84.
- Zarif L, Mannino RJ. Cochleates: lipid-based vehicles for gene delivery-concept, achievements and future development. In N. Habib (ed.). *Cancer gene therapy: past achievements and future challenges*. London: Plenum Publishing Company; 2000 p.83-94.
- Servicio Nacional de Sanidad Animal. Cuba. Disposición 309/2000. Consideraciones éticas para el uso de animales de laboratorio: (Documento regulatorio). La Habana: Servicio Nacional de Sanidad Animal; 2000.
- Acevedo R, Callicó A, Del Campo J, González E, Cedré B, González L, et al. Intranasal administrations of proteoliposome-derived cochleates from *Vibrio cholerae* O1 induce mucosal and systemic immune responses in mice. *Methods* 2009;49:309-15.
- 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. *Pharmacology online* 2006;3:762-4.
- Nunes-Edward PL, Thierman AB, Bassford PJ and Stramam LV. Identification and characterization of the protein antigens of *Leptospira interrogans* serovar Hardjo. *Infect Immun* 1985;48:492-7.
- Machado M, Naranjo M, González M, Batista N, González A, Abreu Y, et al. Inmunoprotección de componentes de membrana externa de *Leptospira pomona* serovar Mozdok. *VacciMonitor* 2007;16(2):7-15.
- Rodríguez Y, González M, Naranjo M, González I, Oliva R y Fariñas M. Evaluación de la capacidad inmunogénica y protectora de componentes extracelulares de *Leptospira interrogans* serovar Canícola. *VacciMonitor* 1997;6(7):11-4.
- Palaniappan R, McDonough S, Divers T, Chen Ch, Pan M, Matsumoto M, et al. Immunoprotection of Recombinant Leptospiral Immunoglobulin-Like Protein A against *Leptospira interrogans* serovar Pomona Infection. *Infect Immun* 2006;74:1745-50.
- Maneewatch S, Tapchaisri P, Sakolvaree Y, Klayasing B, Tongtawe P. OmpL1 DNA vaccine cross-protects against heterologous *Leptospira spp.* Challenge. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2007;25(1):75-82.

---

## **Induced protection by nanocochleates derived from proteoliposomes from *Leptospira interrogans* serovar canicola**

### **Abstract**

Whole cell Leptospirosis vaccines have been developed and used from the 20's of last century up today, most of them are not adjuvated and do not confer a long-lasting immunity. These vaccines are mainly against different serogroups of *Leptospira interrogans* contained in the preparation. Though several attempts to obtain a vaccinal formulation more effective, purer, with wider spectrum and longer protection than the bacterines of inactivated whole cells have been made no vaccine with these characteristics have been registered yet. This paper deals with the obtainment of outer membrane antigens from a Cuban autochthonous strain (Strain 87, *L. interrogans* serovar Canicola), by a modification of the technology for the production of outer membrane vesicles, patented by researchers from Finlay institute. These antigens with nanoproteoliposomic structure were formulated/adjuvated by different strategies, obtaining five preparations with cochlear structures which are nanoparticles of approximately 100 to 150 nm of length and from 15 to 30 nm of diameter. Two doses of the immunogens are inoculated in the biomodel *Mesocricetus aureatus*, with an interval of six weeks. The challenge was carried out with 100.000 DL<sub>50</sub>. Results showed that the new vaccinal formulations confer protection against the homologous challenge and were able to eliminate the carrier status. This, together with the robustness of the preparation method, the higher level of purity, compared to the bacterines, and the no need of aluminium hydroxide make the formulations an alternative of interest for continuing their development.

**Keywords:** *Leptospira interrogans*, nanoproteoliposome, nanocochleates, vaccine.

---

Recibido: Agosto de 2011

Aceptado: Septiembre de 2011