



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID

TRABAJO DE FIN DE GRADO

NANOMATERIALES PARA EL DESARROLLO DE  
NUEVAS VACUNAS

Autor: Adrián Blanco Ortiz

Tutor: Blanca Ortiz

## Índice

1. Resumen.....	3
2. Introducción y Antecedentes	
• Vacunas.....	3
• Antígenos.....	3
• Adyuvantes.....	3
• Nanopartículas.....	4
3. Objetivos.....	4
4. Material y Métodos .....	5
5. Resultados y Discusión	
• Influencia en la respuesta inmune .....	5
○ Componente.....	5
○ Tamaño y forma .....	6
○ Carga superficial .....	7
○ Hidrofilia-Hidrofobicidad .....	8
• Interacción nanopartículas con el antígeno .....	8
• Tipos de nanopartículas .....	10
○ Vesículas de membranas externas.....	10
○ Nanopartículas formadas por moléculas auto-ensamblantes ...	10
○ Nanopartículas de oro .....	12
○ Nanopartículas poliméricas .....	12
○ Otros tipos de nanopartículas .....	16
6. Conclusiones.....	16
7. Bibliografía.....	17

## 1. Resumen

El uso de la nanotecnología a la hora de hacer vacunas está demostrando ser un recurso muy importante. Las nanopartículas no sólo nos pueden valer como agente transportador del propio antígeno, sino que también podemos cargar en ellas otras moléculas que sirvan para dirigir la nanopartícula a una diana específica, o que potencien la respuesta inmunológica frente al antígeno. Por otro lado, también se ve que, en muchos casos, la propia nanopartícula es capaz de potenciar la respuesta inmune inducida por el antígeno.

Se han logrado hacer muchos tipos de nanopartículas distintas usando diferentes componentes. Los tipos de nanopartículas con los que se ha investigado a grandes rasgos se pueden clasificar en: nanopartículas formadas por polímeros, tanto sintéticos como naturales; nanopartículas de oro, nanopartículas liposomales y nanopartículas conformadas por proteínas con capacidad autoensamblante.

## 2. Introducción y Antecedentes

### Vacunas

Las vacunas son una técnica profiláctica consistente en generar inmunidad a determinado patógeno exponiendo a los individuos vacunados a un elemento ante el que el sistema inmune genera una respuesta inmune, celular o humoral, y memoria.

El objetivo de las vacunas es tener una exposición previa al patógeno. De tal forma que la vacuna no genera una infección, pero sí forma una memoria, y si sucede una infección por el patógeno entonces el sistema inmune ya está preparado contra éste.

*M. tuberculosis*, *H. pylori*, *S. aureus*, *C. trachomatis* han probado ser bacterias especialmente difíciles de crear una vacuna. Es debido a su capacidad de generar mecanismos de evasión contra la respuesta inmune. Ante la ineficacia de los abordajes tradicionales (como vacunas del microorganismo atenuado o inactivado), nuevas formas de desarrollo de vacunas son necesarias contra estos patógenos. (1)

Se vio futuro en las vacunas de subunidades, sin embargo, debido a que se eliminaba el microorganismo se eliminaban con él otras múltiples moléculas que podían estimular la respuesta inmune (los PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos), la eficacia de estas vacunas era baja. (1)

### Antígenos (AG)

Son las moléculas que el sistema inmune reconoce como extrañas y ante las cuales reacciona. Generalmente, los antígenos que el sistema inmune reconoce son proteínas que expresan en la superficie de los patógenos.

### Adyuvantes (ADY)

Son moléculas distintas de los antígenos pero que se administran junto a éstos. El objetivo de los adyuvantes es potenciar la respuesta inmune contra el antígeno sin provocar reacciones per sé contra ellos, sino contra el antígeno.

Adyuvantes que se han usado muy generalizadamente son las sales de aluminio, MF59, AS03 o Montanide ISA 51 o virosomas. (2)

Las razones para el uso de los adyuvantes son muchas, pero destaco que reducen la dosis necesaria de AG: el ADY es capaz de conseguir que con menor cantidad de AG (en dosis o en número de administraciones) se consiga una respuesta inmune similar. No sólo eso,

sino que también se puede modular el tipo de respuesta inmune que queremos contra el AG determinado. Se ha visto que, ante determinadas infecciones, ambos tipos de respuesta inmune (humoral y celular) no son igual de eficaces. Por otro lado, también son capaces de conseguir acelerar la formación de la memoria contra el AG (3, 4)

### **Nanopartículas (NP)**

Son formulaciones caracterizadas por su tamaño en el intervalo entre 1-1000nm. Las razones de su reciente investigación para el desarrollo de vacunas son:

- Incrementa en gran medida la estabilidad de las vacunas
- Alta inmunogenicidad
- Liberación en diana
- Liberación lenta (5)

Las NP son capaces de cargar un péptido que sea el antígeno de un determinado patógeno, una proteína en cuya estructura existan varios epitopos o un plásmido de DNA o RNA que codifique para esos epitopos. Este tipo de vacunas de subunidades de un patógeno tiene la ventaja de ser mucho más seguras que vacunas de microorganismos, pero son mucho menos inmunoestimulantes porque ya no existen esas señales coestimulantes. Para contrarrestar esto, se cargan también en la nanopartícula moléculas adyuvantes.

En general, el mecanismo que sucede en el organismo al administrar estas nanopartículas es el siguiente: las nanopartículas son captadas, mediante fagocitación por pinocitosis (6), por las células presentadoras de antígenos (las siglas en inglés son: APCs) en el lugar de administración. Esta captación activa a las APCs y se trasladan hasta los nódulos linfáticos. Una vez allí, realizan la presentación del antígeno a los linfocitos T. (7)

Entre las APCs, se diferencian dos tipos de células: las células dendríticas (las siglas en inglés son: DCs) y macrófagos (8)

### **3. Objetivos**

El objetivo principal de este trabajo es hacer un resumen de los trabajos publicados que estudian la posible aplicación de nanopartículas en el ámbito de las vacunas. Al ser un trabajo recopilatorio, otro objetivo es hacer que sea lo suficientemente divulgativo como para que llegue al mayor número de personas posible sin perder demasiado rigor.

### **4. Material y Métodos**

Para este trabajo recopilatorio se ha hecho uso de diversas bases de datos online: principalmente Pubmed y el Catalogo Cisne de la Biblioteca Virtual UCM; pero también se ha buscado información en otras bases de datos online como SciFinder, IsiWeb of Knowledge, Sci-Hub y el Scholar Google. Para su redacción, el programa informático empleado fue Microsoft Office Word 2007 más la ayuda del gestor bibliográfico EndNote. A la hora de hablar de los conceptos más básicos se han usado los apuntes hechos por el alumno a lo largo de la carrera.

La metodología empleada fue analizar diversos textos como libros virtuales o textos en bases de datos sobre la aplicación de nanopartícula compuestas a partir de diferentes materiales. Tras el análisis, el objetivo es hacer un resumen de los contenidos.

## 5. Resultados y Discusión

La vacunación se está viendo como la medida defensiva que necesita avanzar con mayor urgencia. Ésto se debe a nuestra falta de desarrollo de nuevos antibióticos y a la evolución de los mecanismos de resistencia de los microorganismos.

El desarrollo de la nanotecnología puede ser clave ya que permite el transporte en la misma NP del antígeno más otras moléculas adyuvantes.

Nuevos avances en la nanotecnología permiten que seamos capaces de introducir nuevas estrategias, nuevos materiales y nuevas funciones (como protección vs enzimas). Por ejemplo, actualmente somos capaces de cargar en las nanopartículas ácidos nucleicos o proteínas recombinantes como antígenos. Además, cargar conjuntamente a los antígenos muchos tipos de adyuvantes. (1)

Una de las mejores estrategias desarrolladas para las nanopartículas es la capacidad para dirigir las a dianas específicas, como el tejido linfático. De esta forma, no solo se mejora la eficacia, sino que sobre todo se minimizan los posibles efectos negativos que pudieran surgir. (9)

### **Influencia en la respuesta inmune**

Las propiedades de las NP que influyen en la respuesta inmune son:

- Componente

El peso molecular de los componentes modula la liberación del AG al exterior de forma inversamente proporcional. Es decir, a mayor sea su peso molecular, menor liberación habrá.

Además, estos componentes poseen una gran cantidad de grupos funcionales, los cuales son usados para unir otras moléculas por conjugación. El objetivo de esto bien puede ser la protección de la NP contra el medio (contra pH o condiciones redox que lo degeneren) o para dirigirlo a una diana específica. Por ejemplo, en vacunas de DNA, es necesario proteger éste del ambiente ácido del endosoma, ya que el DNA debe ser expresado para producir el AG. (10)

Se ha buscado ser capaces de conseguir una presentación doble del AG (tanto por vía MHC c. I y c. II) en algunos ensayos con nanogeles. La idea consiste en ser capaces de escapar el medio ácido y reductor del interior del lisosoma, para lo cual estas NP liberaban oligo-nucleótido y péptidos para contrarrestar la acidez del medio. De esta forma se evitaba la fusión a lisosomas y por el contrario se consigue que el procesamiento y presentación del Ag sea por 2 rutas: citosólica (MHC c.I) y exógena (MHC c.II). Este "cross-presentation" se ha conseguido con nanogeles de PLGA cargados con ovoalbúmina (OVA) como Ag y nanogeles de PLGA cubiertos de protamina. El resultado fue una respuesta inmune mucho mayor, en comparación con el mismo AG simplemente disuelto. (11)

Incluso hay estudios de vacunas contra VIH que usan nanogeles. Glicoproteína (gp) 120 fue el AG que se encapsulo en nanogeles de  $\gamma$ -PGA y administrados por vía intranasal a ratones. Los resultados muestran la inducción de células T CD8+ y células de memoria contra el AG. (12)

- Tamaño y forma

Estas dos propiedades influyen en la respuesta inmune tanto cuanti como cualitativamente.

El tamaño de partícula es el factor más importante a la hora de determinar si las partículas serán captadas por las DC o no. Partículas con diámetro >100nm son captadas por DCs desde el mismo sitio de administración y luego éstas viajan hasta los nódulos linfáticos, donde presentan el AG a las células T. Por otro lado, NP con un diámetro <50nm son capaces de llegar hasta los vasos linfáticos, donde son captadas por las dc que allí residen. Ésto se demostró para los hidrogeles en un estudio con nanogeles y microgeles de PLGA, viéndose que la captación de estas partículas era mayor que la del control, pero que la captación de los nanogeles fue aún mayor que la de los microgeles. (13)

Para el transporte de las vacunas a través de mucosas, el tamaño de las NP también juega un papel crucial. Lo que se ha observado es que para NP con diámetro >100nm, el penetrar la barrera mucosa es sumamente difícil. Sin embargo, aquellas con un diámetro <50nm si difunden bien. (14)

El tamaño de las NP es crucial también para su capacidad de estimular una respuesta inmune. Se debe a que su tamaño determina la posibilidad de ser captados por las DCs, y que así estas maduren.

En un estudio se investigó la influencia del tamaño en el tipo de respuesta inmune generada. Se usaron para ello NP y MP de PLA que encapsulaban HBsAg. Mientras que las NP estimularon la producción de IFN- $\gamma$  y una respuesta de tipo Th1; las MP promueven una respuesta de tipo Th2 y la producción de IL-4. No obstante, en otros estudios que usaban Ag de *Bordetella pertussis*, las NP estimulaban la respuesta Th2 mientras que las MP, la respuesta Th1. (15)

El tipo de respuesta inmune no es el único factor afectado sino también su intensidad. En un estudio realizado usando nanogeles de PLA encapsulando HBsAg, con diferentes diámetros, se consiguieron distintos títulos de anticuerpos para cada distinto diámetro. Sin embargo, diferentes estudios muestran que el tamaño de partícula idóneo para conseguir la mayor respuesta inmune variaba en cada ocasión y que la relación tamaño-efecto tampoco era comparable. (16)

Además, aunque las NP sean captadas con mayor voracidad por los macrófagos que las MP, son las MP las que generan una respuesta inmune más intensa (los niveles de anticuerpos son mayores). Esta relación tamaño-intensidad fue probada en un estudio en el que se encapsuló albúmina bovina en partículas de PLGA, micro y manométricas. Las MP de PLGA provocaron mayores niveles de IgG anti-albumina que partículas más pequeñas. No obstante, esta relación tamaño-intensidad ha sido negada en otros estudios realizados usando AG de Neisseria y HIV, en los que no se observó distinción. (17)

Estudios de diámetro de NP muestran que el diámetro al que existe mayor captación por parte de DCs varía para cada material.

- Para el poliestireno, el diámetro a la que se consigue mayor captación por parte de las DCs es: <500nm.
- Para el PLGA, el diámetro a la que se consigue mayor captación por parte de las DCs es: 300nm aprox
- Para el PLA, el diámetro a la que se consigue mayor captación por parte de macrófagos es: entre 200-600nm (5)

La forma de las NP influye sobre todo en los procesos de transporte. Está probado que las NP con formas esféricas y cilíndricas son más fagocitadas que las que tienen forma de disco o de elipse. Por otro lado, NP alargadas son capaces de evitar la fagocitosis durante más tiempo; y, junto a NP planas, son dirigidas mejor a la diana que las NP esféricas. (18)

Para NP con diámetro >1µm, su forma ejerce mucha influencia en su fagocitosis por macrófagos. La forma de la interfase condiciona mucho la fagocitosis. (18)

La fagocitosis en esferas se ve mucho más aumentada que en NP con forma de gusano. Ésto se constató en un estudio realizado con AuNP. En éste, la estimulación de la respuesta inmune se vio que era mayor en esferas de 40nm que en cubos y varas. (18)

- Carga superficial

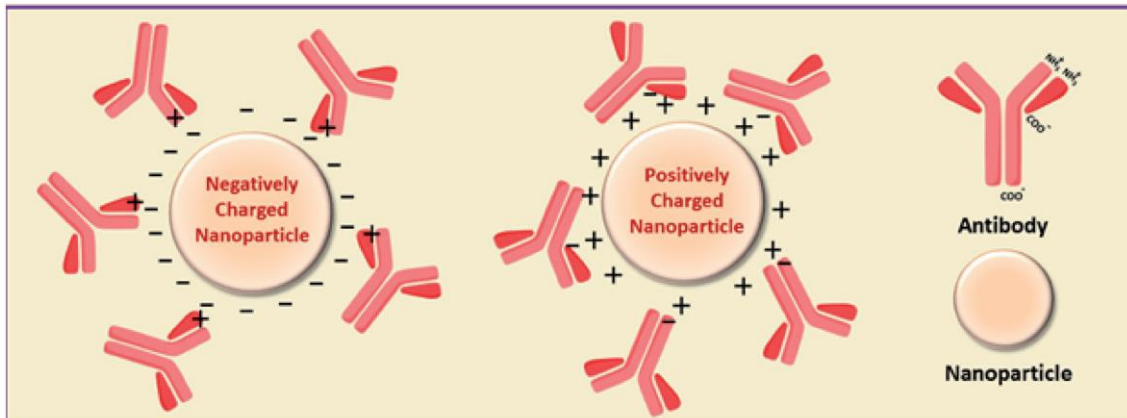
La existencia de carga eléctrica en la superficie de las NP puede afectar a su adhesividad a tejidos biológicos (bioadhesividad), capacidad de carga, estabilidad y comportamiento in vivo. (19)

NPs con carga negativa suelen provocar que la eficacia en la encapsulación de DNA y su estabilidad sea baja. Al contrario, nanopartículas con carga positiva forman complejos con los plásmidos de DNA mediante interacciones electrostáticas, favoreciendo su encapsulamiento y aumentando su estabilidad. No obstante, también se pueden formar interacciones electrostáticas con proteínas de la sangre, iones y otras sustancias con carga eléctrica negativa. Todas estas interacciones o deseadas pueden provocar alteraciones en la estabilidad del NP. (Ver figura 1)

NPs catiónicas han demostrado potenciar la inmunogenicidad tanto por administración mucosa (viéndose en la mucosa anticuerpos y células T) como sistémica. (20)

En la administración intranasal, al haber interacciones electrostáticas entre el mucus (que contiene gran cantidad de aniones) y las NP catiónicas, el tiempo de residencia de éstas es muy grande. Esta circunstancia es beneficiosa ya que la cantidad de Ag que se puede liberar es mayor. Por esta razón, NP mucoadhesivas están siendo muy investigadas para el transporte de proteínas por vía intranasal. Se está investigando con polímeros naturales derivados de quitosán como, por ejemplo, en los estudios realizados sobre toxoide tetánico encapsulado en N-trimetil-quitosán (TMC) catiónico. En este estudio, los resultados mostraron que sí se estimulaba la respuesta inmune en ratones y en mayor medida que el control. Otros estudios que comparaban TMC catiónico con MMC catiónico probaban que el primero induce una respuesta inmune mayor. (21)

Las NP con carga positiva (las catiónicas) son las que NP captadas con mayor voracidad por las APC. Esto se debe a que la superficie de las células está cargada negativamente, atrayendo así a las cargas opuestas. Existen estudios in vitro con NP de poliestireno con carga en la superficie, en los que se vio que la influencia de esta carga varía dependiendo del diámetro de la NP. Mientras que las NP de 1mcg sí se mejoraba su captación, en NP de 100nm no. También existen estudios in vivo con liposomas cuya superficie estaba cargada positiva y negativamente. (22)



(Fig. 1: imagen tomada de referencia 80. Representación de la influencia de la carga en superficie.)

- **Hidrofilia-Hidrofobicidad**

Biomateriales, y en especial biopolímeros, que muestren dominios hidrofóbicos son capaces de provocar un efecto adyuvante per sé. Se debe a que imitan en cierta forma estructuras biológicas que pueden potenciar el efecto de los AG sobre la respuesta inmune. (23)

En estudios en ratones con toxoide diftérico se ha demostrado que existe una correlación positiva entre la hidrofobicidad (en nanogeles de PLGA, PCL y mixtos) y el nivel de IgG anti-TD. (24)

No obstante, el mecanismo que lo explica es incierto todavía, aunque se sospecha que involucra a los TLRs (sobre todo TLR4) y al sistema del complemento.

Sí se sabe que los dominios hidrofóbicos expuestos al exterior interaccionan rápidamente con proteínas plasmáticas y adsorben otras sustancias. Como consecuencia, se puede alterar la fagocitosis y, por tanto, la función de las NP. Una técnica clásica para evitar este suceso es anclar a la superficie de las NP cadenas de PEG (el cual es un polímero hidrófilo), no obstante cadenas demasiado largas también alteran la función de las NP. (25)

El carácter hidrofílico - hidrofóbico de las NP supone un problema para el desarrollo de éstas y es necesario un gran control de este aspecto.

### **Interacción nanopartículas con el antígeno**

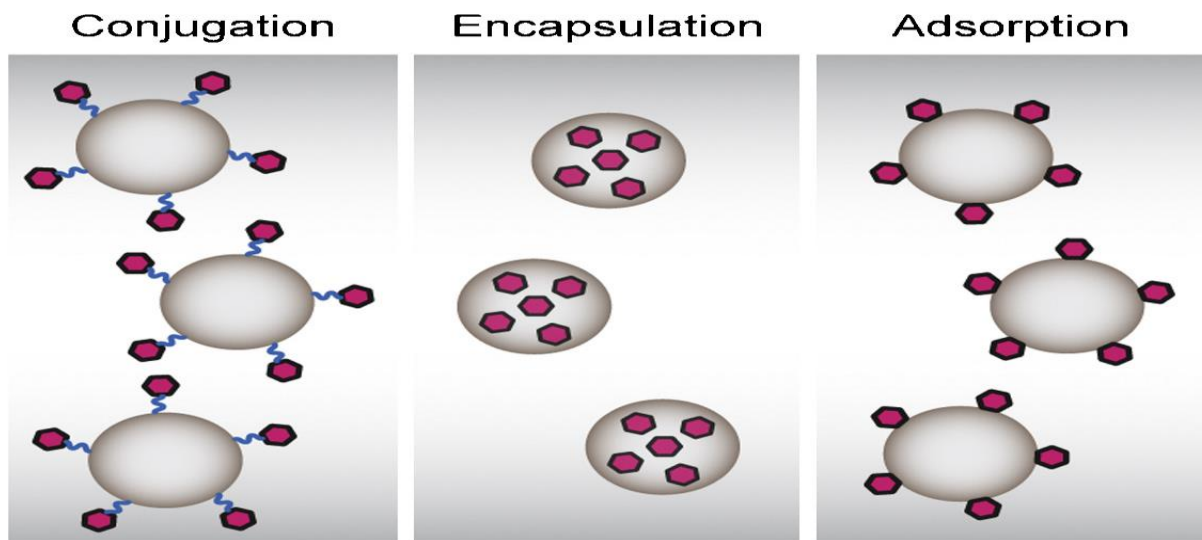
Hay 2 situaciones posibles que ocurren cuando usamos nanopartículas para transportar vacunas. La primera es que las NP transportan el AG a APC cerca del lugar de administración. Como consecuencia, ambas NP y AG son fagocitados por la APC, son procesados y transportados hasta nódulos linfáticos, donde el AG es presentado a los



linfocitos. En el segundo caso, es necesario evitar el sistema inmune, por tanto, la NP actúa como agente protector del AG.

Las posibles interacciones de la NP con el AG son (ver figura 2):

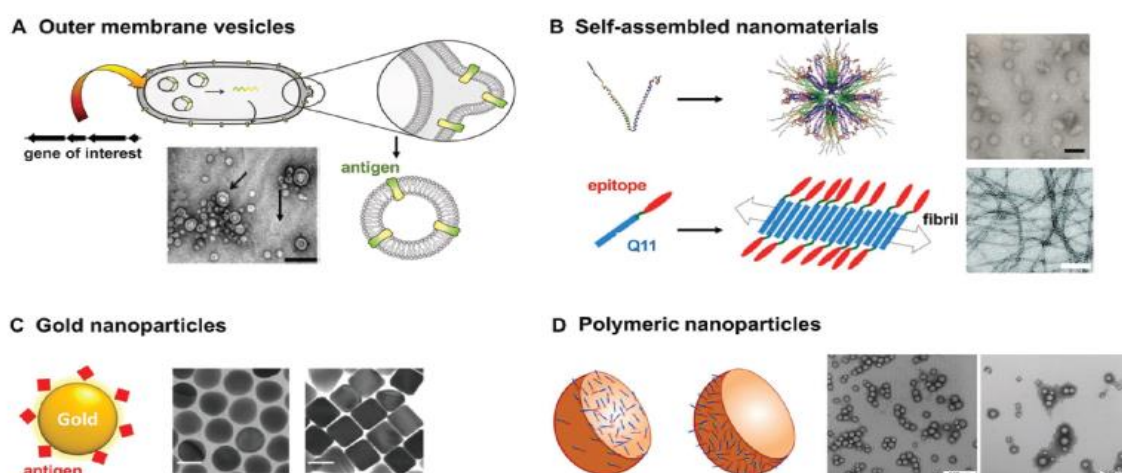
- **Adsorción**  
La unión del AG a NP duras, las cuales son la sílica, oro y fosfato de calcio; sucede mediante tres posibles mecanismos. La adsorción en la superficie de la NP es uno de estos mecanismos y para que sea posible es muy importante la hidrofobicidad de la NP. Aunque la adsorción del AG es el mecanismo más importante que sucede en NP duras, la conjugación y la encapsulación son otros dos mecanismos mediante los cuales también se puede unir el AG. Hay que tener en cuenta que la unión del AG mediante adsorción se debe a la formación de enlaces débiles, luego existe siempre el riesgo de disociación de la partícula. (26)
- **Encapsulación**  
Se mezcla el AG con el precursor de la NP y se forma la NP a la vez que se encapsula dentro el AG.  
Este proceso tiene el gran beneficio de asegurar que el AG sólo se libera cuando se descompone la nanopartícula dentro del organismo (27)
- **Conjugación química**  
Se forman enlaces covalentes en la superficie de la nanopartícula entre ésta y el AG y/u otras moléculas.  
Este proceso tiene el gran beneficio de asegurar que el AG sólo se libera cuando se descompone la nanopartícula dentro de la diana.  
Uso en NP de materiales blandos y suaves, como VLPs o liposomas. (28)



(Figura 2: imagen modificada, obtenida de referencia 5. Ilustra la unión entre NPs y AGs)

## Tipos de nanopartículas

Los tipos de nanopartículas están clasificados en este documento en 4 grandes grupos (ver Fig. 3)



(Fig. 3: imagen sacada de la referencia 1. Ilustra los tipos de NPs)

### Vesículas de membranas externas (las siglas en inglés son: OMV)

Son en realidad proteoliposomas con un tamaño de 50–250 nm. Formadas a partir de proteínas, fosfolípidos, LPS y componentes periplásmicos. Por tanto, son muy similares a las superficies de las bacterias, pero con un tamaño mucho menor, lo que facilita la captación por APCs. (29)

Se preparan usando bacterias modificadas genéticamente, las cuales liberan estos OMV. Al ser originados por las bacterias, pueden llevar moléculas en su superficie (son los PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) que pueden aumentar la respuesta inmune ante el AG que encierran. Es decir, actúan como ADY per sé. (30) Se ha visto en concreto con OMV generadas a partir de *E. coli* Nissle 1917 que se estimulaba más la respuesta humoral, en forma de IgG. (31)

Existen ya estudios clínicos con vacunas de OMV contra meningococo serogrupo B. Se ha visto que la respuesta inducida es poco duradera en la primoinfección. Por ello, para obtener una protección suficiente son necesarias 3 dosis. Aun así, esta vacuna tiene una eficacia demostrada a la hora de controlar esta infección. (32)

En el futuro, se espera incluir en la misma vacuna múltiples AG del meningococo y así ampliar la cobertura de la vacuna contra múltiples tipos de meningococo.

Otra forma de elaborar estos liposomas es encerrando el AG en el núcleo y expresando glicoproteínas virales en su exterior, formando estructuras muy similares a virosomas. (33)

### Nanopartículas formadas por moléculas auto-ensamblantes

Las moléculas con una naturaleza anfipática son capaces de ensamblarse espontáneamente al llevarlas a un medio acuoso. (34)

Las más usadas son los liposomas. Los componentes preferidos para formarlos son fosfolípidos como DC-colesterol, DOTAP o DDA. Sus características

(biocompatibilidad, adyuvancia per sé y facilidad para incorporar carga) hacen que sea uno de los tipos de NP más estudiados. (34)

VLP (Virus-Like Particles):

Son sistemas de transporte nanométrico con una estructura similar a las cápsidas de los virus: son proteínas de cápsida autoensamblantes sin el material infeccioso.

Alcanzan rangos de tamaño menores incluso de 100nm y su composición los hace ser capaces de estimular una respuesta inmune y potenciar la que el AG provoca. Son el tipo de NP más estudiado. (35)

El uso de las VLP como NP carrier de Ag se ha extendido incluso para las vacunas contra virus, como hepatitis B o papiloma. El estudio de VLP como transportadores se hizo usando VLP de HBV compuestas por CFP-10 de micobacterias (como Ag) y HBV-core-fusion-protein. El resultado observado fue que, incluso sin la necesidad de añadir un ADY, estas VLP inducían una respuesta inmune contra CFP-10 mayor que la proteína por si sola. El tipo de respuesta inmune inducida también era muy positiva, pues se inducía una respuesta Th1 (inmunidad celular) más la producción de IgG, interferón-gamma, y también IL-2. (36)

Fueron las primeras en salir al mercado y han sacado al mercado en 2006 (vacuna contra Papilomavirus) y 2011 (vacuna vs HEV). Existe alta evidencia en seguridad. Uno de sus puntos más fuertes es la capacidad que tienen para inducir una respuesta inmune potente incluso sin usar adyuvantes (37, 38, 39)

Se han hecho otros estudios usando papaya mosaic virus (PapMV) NP. Éstas estaban formadas por las proteínas que envuelven al virus más un ssRNA (virus ARN monocatenario negativo) sintético, no codificante, como ADY. La respuesta inmune que manifestaron los ratones del estudio consistió en una fuerte proliferación de DC, neutrófilos y macrófagos. En otros estudios se investigó la aplicación de estas NP de PapMV usando Ag de virus Influenza y como adyuvantes para la inmunización contra *Listeria monocytogenes*. (40)

El uso de la ferritina como proteína autoensamblante también se ha investigado para el desarrollo de vacunas. Se ha usado en concreto la ferritina de *H. pylori*, la cual se agrupa en octaedros de 12 nm, formados por 24 subunidades, que dejan un espacio interior. Son moléculas de ferritina genéticamente modificadas tal que en su extremo N-t se le añade el AG, que luego se muestra hacia el exterior. Se han usado como transportadores de hemaglutinina, demostrando ser una vacuna contra la gripe cuya eficacia superaba a la vacuna del virus inactivado. (41)

En otros estudios con ferritina, mediante ingeniería genética se fusiona la hemaglutinina de Influenza a ferritina. Se produce autoensamblaje formándose una nanopartícula octaédrica con 8 espinas de hemaglutinina. Como resultado, se consiguió mayor potencia en la respuesta inmune que con la vacuna trivalente. Ej. MVP: 96 unidades se juntan. (42)

En otros estudios se ha investigado el uso de ribonucleoproteínas de eucariotas, cuya capacidad para ensamblarse en estructuras cilíndricas huecas resulta interesante. El AG utilizado en el estudio fue Chlamydial Major Outer Membrane Protein (MOMP). La vacuna consiguió estimular la producción de citoquinas proinflamatorias y la captación del AG por DCs. (43)

Se ha trabajado con ciertos péptidos capaces de ensamblarse entre sí mediante fuerzas no covalentes. Éstos péptidos en su estructura poseen dominios en forma de hélice (coiled-

coil domains). En un estudio en el que unieron Ag de malaria a estas construcciones se vio que sí se conseguía una respuesta inmune. (44)

Un péptido de este tipo estudiado fue el Q11. Tienen la particularidad de ser capaces de agruparse formando nanofibras. Múltiples tipos de epitopos y grupos químicos pueden ser enlazados a estos péptidos. No solo se ha estudiado su capacidad como carrier sino también sus propiedades como ADY en estudios hechos con OVA conjugado a Q11. El grupo de ratones a los que se administró OVA y Q11 no conjugados no desarrollaron respuesta inmune contra OVA. Por el contrario, el grupo con OVA-Q11 conjugados sí. (45)

Otras moléculas autoensamblantes estudiadas fueron lipopéptidos. Se basaba en enlazar Ag a la fracción lipídica de estos lipopéptidos, los cuales son capaces de autoensamblarse espontáneamente en estructuras con formas micelares. Las formas que podían adquirir variaban entre cilindros nanométricos a nanoesferas, dependiendo de las secuencias de las proteínas. La fracción lipídica podía estar constituida por distintos ácidos grasos como el palmítico. También han demostrado capacidad adyuvante, en un estudio que usaba Ag de *Streptococcus*. (46)

Se pueden usar proteínas obtenidas de la pared celular de algunas bacterias. Dominios de estas proteínas que han demostrado capacidad adyuvante fueron las fracciones lipídicas Pam2Cys y Pam 3Cys. Activan diferentes cascadas de señalización (TLR2/TLR6 y TLR2/TLR1) además de promover la formación de la estructura micelar (porque poseen ácido palmítico). Ya se han hecho pruebas con diversas NP basadas en lipoproteínas que contenían Pam2Cys y Pam 3Cys para vacunas contra bacterias y virus, como Influenza o HCV. Estas vacunas demuestran estimular los dos tipos de respuestas inmune (celular y humoral). (47)

### **Nanopartículas de oro (AuNP)**

El oro es el metal más empleado en la elaboración de NP. Se debe a su capacidad para transportar moléculas, es biocompatible y las NP de Au son fáciles de sintetizar. (48)

La elaboración de AuNPs necesita la reducción de sales de oro (como AuCl<sub>3</sub>) para obtener el Au que será el núcleo de la NP. Se pueden conseguir NP con muchas formas distintas, como nanoesferas o tubos, mediante métodos de elaboración “seed-mediated growth”. (49)

En la superficie de las NP se adsorben o se unen químicamente diversas moléculas que se usan para estabilizar la NP y como punto de anclaje para otras moléculas que se usaran como ligandos. Entre estas moléculas que se unen a la superficie de las AuNP las más frecuentemente usadas son los tioles. Posteriormente se usan para unir proteínas, péptidos u oligonucleótidos.

Se ha visto en las AuNP una cierta capacidad adyuvante ya que por distintos mecanismos son capaces de potenciar una respuesta humoral (mediante la promoción del reclutamiento de células inmunes, la presentación de Ag por DC y la producción de citoquinas). Esta capacidad ADY está bien ilustrada en estudios del efecto de AuNP sobre macrófagos y BMDC. La forma de las NP se vio además que es uno de los factores más importantes que determinan la capacidad adyuvante de las AuNP. Las formas esféricas y cuadradas son capaces de potenciar la respuesta inmune. El tamaño de las NP también demostró ser otro de los factores moduladores de la respuesta inmune: las NP entre 8-17nm eran las que más potenciaban la respuesta inmune.

El uso de AuNP como carrier de vacunas se ha estudiado para varias bacterias: *P. aeruginosa*, *L. monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae* o *Yersinia pestis* son algunas. (50, 51)

### **Nanopartículas poliméricas**

Son matrices poliméricas que son usadas como medio de transporte de los AG y ADY.

Entre sus propiedades se cuentan su biocompatibilidad, su capacidad para ser degradados en el organismo (son biodegradables). Además, los polímeros que se usan no son tóxicos para el ser humano. (52)

Polímeros más usados son el PLGA y el quitosán. Sin embargo, también se han hecho estudios con poliestireno y polietilénimina.

Las técnicas de elaboración de estas NP más frecuentes son emulsión-evaporación y nanoprecipitación. Las NP que se consiguen mediante estas técnicas son esferas, las cuales encierran o son conjugadas a las moléculas que van a transportar. Dependiendo de las condiciones de elaboración, su diámetro oscila entre 10nm y 1 µm. Así mismo, también podemos controlar la carga que presentan en superficie. (52)

Las nanopartículas poliméricas son capaces de transportar moléculas mediante 2 mecanismos: encerrándolas en su interior o enganchándolas en su superficie. El método empleado es un factor importante en el desarrollo de la respuesta inmune.

La encapsulación estimula preferentemente la producción de linfocitos T CD4+ e IgG. Por otro lado, si el AG se localiza en la superficie de la NP, es la producción de linfocitos T CD8+ la que aumenta. Se necesita más investigación para poder determinar las razones por las que se estimulan vías distintas, ya que actualmente se tienen observaciones contradictorias. Se ha visto que cuando el AG está conjugado en la superficie tiene más facilidad para liberarse del NP una vez está dentro del endosoma. Desde el endosoma puede escapar al citoplasma y terminar llegando a ser presentado a MHC-I y reconocido por células T CD8+. Por el contrario, AGs encapsulados resisten dentro del lisosoma y terminan siendo estimulando la vía CD4+. No obstante, también se ve en algunos estudios respuesta CD8+, así que en definitiva son necesarios más estudios. (53)

A la hora de incorporar un ADY a la formulación, también se puede hacer mediante las mismas 2 vías que el AG. No obstante, como la tendencia es que la NP emule a los patógenos (en su estructura), los AG suelen estar conjugados al polímero y expuesto en la superficie de la NP, mientras que los ADY son encerrados en el interior (similar a virus) o también se exponen al exterior (similar a bacterias: como sus PPRs). El objetivo fundamental de mimetizar patógenos es asegurar tanto transporte de AG y ADY como que exista una respuesta inmune contra éstos. (54)

### **PLGA y PLA**

Son polímeros sintéticos. PLGA son las siglas de poliácido láctico-co-glicólico mientras que PLA son las siglas de poliácido láctico. (55)

Los polímeros más usados en investigación son el PLGA y PLA. Además, se han usado en estudios de liberación prolongada. NP de PLGA encapsulando OVA (un AG de ovoalbúmina) demostraron ser capaces de inducir una respuesta inmune aun mayor y más prolongada que la de NP liposomales (de tamaño similar) con alumbre. (56)

En otro estudio, realizado con NP de PLGA, se comparó la diferencia de eficacia entre NP recubiertas del AG y NP que encapsulan el AG. El AG fue el epitopo J14 de los estreptococos del grupo A. El resultado obtenido fue que las NP que encapsulaban el AG promovían en mayor medida la maduración de DCs y la producción de Igs contra el AG. (57)

Se ha investigado la aplicación de NP de PLGA y PLA para la administración de vacunas por vía intranasal. Se consiguieron resultados positivos para infecciones bacterianas como *Yersinia pestis*. (58)

Se han hecho estudios de inmunización de ratones usando NP de PLGA que encapsulaba TRP2 cotransportado con 7-acil-lípido A (agonista de TLR4). El objetivo de este estudio era determinar la eficacia en la protección contra melanoma y el resultado de esta formulación fue muy positivo, sobre todo porque uno de los AG empleados es un auto-AG y lo que se consiguió fue estimular células Tc. (59)

Las NP de PLGA se han descrito como vehículos eficaces a la hora de alcanzar las APCs situadas en órganos linfáticos.

Se ha investigado el uso de NP de PLGA para el co-transporte de varios AG simultáneamente. Uno de los estudios sobre ello fue hecho usando HBcAg (Ag del núcleo) más lípido monofosforilo A (monophosphoryl lipid A), administrados por vía SC a modelos murinos. Los resultados obtenidos muestran que la formulación promovió la respuesta Th1 contra el HBcAg y la producción de IFN- $\gamma$ . Otros estudios de co-transporte de OVA más lípido monofosforilo A dentro de NP de PLGA prueban la inducción de sendos tipos de respuesta inmune, celular más humoral. (60)

Se ha estudiado el uso de NP para elaborar vacunas de DNA. En este estudio que expongo, se empleó DNA codificante de Rv1733c (un AG de *M. tuberculosis* cuando está en periodo latente). La administración, por vía respiratoria a ratones, reveló que se producía una proliferación de células T y producción de IFN- $\gamma$ , que era superior a la administración, de la misma formulación, por vía intramuscular. (61)

#### PLA

Han sido descritos estudios que usaban NP de PLA cubiertas con p24 (un AG de HIV) y gp120, administrados por vía subcutánea a ratones, conejos y macacos. Las conclusiones de este estudio determinan que la co-adsorción de ambas moléculas en la superficie de la NP no alteró la inmunogenicidad que ambas producen. (62)

También existen otros estudios que muestran la eficacia de las NP de PLA a la hora de co-transportar varios AG simultáneamente. Por ejemplo, en el estudio que se hizo con NP de PLA que encerraban en su interior OVA más poly-U (poly(uridylic acid), un agonista de TLR), se vio que este co-transporte provocaba un aumento en los niveles de IFN- $\gamma$  liberados por células T. (63)

En otros estudios se ha investigado la eficacia de NP de PLA, cubiertas por PEG, encapsulando DNA codificante para  $\beta$ -galactosidasa. El estudio reveló que estas NP inducían una respuesta inmune en forma de Ig anti-  $\beta$ -galactosidasa (64)

#### $\gamma$ -PGA

En ratones, a los que se administró NP de  $\gamma$ -PGA cargados con listerolisina, se observó protección contra la infección provocada por *L. monocytogenes*, y sin necesidad de añadir adyuvantes a la formulación. (65)

Otras investigaciones se han realizado para vacunas de administración oral. Se han desarrollado NP poliméricas recubiertas de PMMMA capaces de resistir el medio gástrico. El recubrimiento de PMMMA al pasar al medio básico del intestino se disuelve y las NP con los AG anclados a la superficie son revelados. Esta idea ha sido testada usando AG proteicos de estreptococos del grupo B dando resultados muy positivos. (66)

#### Quitosan

Hay estudios realizados con NP de quitosan que están conjugados al AG MAGE-3 (melanoma-associated antigen 3) sobre ratones. Se observó que las células T atacaban a células que exponen este AG y con ello se consigue reducir el tamaño del tumor. (67)

Otros estudios usaron NP de quitosan que encapsulaban superóxido dismutasa B1 de Leishmania. El resultado fue la protección contra el patógeno mediante la estimulación de la respuesta humoral (Th1). (68)

Se ha investigado también una posible inmunización contra la hepatitis B usando NP de quitosan encapsulando HBsAg recombinante. No obstante, en estos estudios, no se observó respuesta inmune a nivel sistémico. (69) Sin embargo, estudios posteriores sí detectaron la formación de IgG anti-HBsAg recombinante. (70)

En estudios realizados con NP de TMC (tri-metil-chitosan) cargadas con la subunidad H3N2 de Influenza A se pudo observar la estimulación de IgG e IgA (a nivel local en la administración IM), en mayor medida que los niveles producidos por el antígeno disuelto. (71)

También se han realizado estudios buscando una vacuna eficaz contra H. pylori usando como AG la ureasa. Se cargó la ureasa dentro de NP de TMC y se administraron por vía oral y subcutánea. La respuesta inmune que se pudo observar fue la producción de IgA e IgG en la administración oral, y de IgG en la sistémica. (72)

Nanopartículas de TMC conjugadas con OVA covalentemente demostraron resultados mejores que la administración de sólo OVA o de la mezcla de ambos. El parámetro que controlaba los resultados de este estudio fue el nivel de IgG anti-OVA. (73)

#### Manano y pululano

Estudios realizados con NP de manano y pululano conjugados a colesterol y a la oncoproteína Receptor del factor de crecimiento epidermal humano 2 (cuyas siglas en inglés son HER2) revelaron que se inducía la respuesta de linfocitos T CD8+ contra células tumorales HER2+. Las NP de pululano (CHP) fueron las más eficaces en este estudio y es con el CHP con el que más estudios se han realizado sobre NP vacunales. (74)

Otro ejemplo del uso de CHP fue en el estudio CHP-NY-ESO-1, que investigaba el uso de Ag NY-ESO-1 (New York-esophagus-1) como posible vacuna en el tratamiento del cáncer esofágico. Aun viéndose la estimulación de células CD4+ y CD8+, el crecimiento tumoral no pudo ser controlado. Una alternativa considerada fue la combinación de la vacuna CHP-NY-ESO-1 con la vacuna CHP-HER2 para tratamiento de cáncer esofágico, pero la eficacia siguió siendo deficiente. (75)

#### Nanogeles:

Son hidrogeles compuestos por polímeros y con un tamaño nanométrico. Los polímeros que los componen son generalmente de naturaleza anfifílica o hidrofílica. (76)

Sus características más prometedoras como carrier de vacunas son: estructura química y física modificable a nuestros objetivos, diámetro ajustable, presentan una gran superficie específica, lo cual se aprovecha para anclar diferentes tipos de moléculas; son biocompatibles, tienen gran capacidad de carga y son relativamente estables. (77)

La posibilidad de modular estas NP no solo química y físicamente, sino de también incorporar a su superficie moléculas que actúen de ligando nos permite dirigir las e incluso que superen barreras típicamente infranqueables.

Para la elaboración de nanogeles se usan tanto polímeros naturales como dextrano, dextrina, pululano, quitosan, ácido hialurónico o alginato; como polímeros sintéticos como poli-metil-metacrilato (PMMA), poli-ácido láctico (PLA), poli-ácido glicólico (PGA) o poli-ácido láctico-co-glicólico (PLGA).

Estudios in vitro han revelado que el uso de estos componentes para la elaboración de nanogeles sí conseguirían estimular una respuesta inmune. Ésto es evidenciado en que la exposición de DCs a nanogeles provoca que expongan al exterior MHC c. II, otras moléculas co-estimuladoras; y secreten citoquinas como CD40 o CD83. (78)

Además, se conoce que estas NP no sólo son capaces de transportar Ag y ADY, sino de funcionar como ADY per sé. (79)

Otro objetivo adicional que se puede conseguir con estas formulaciones es la presentación prolongada del AG a las células inmunes. Se ha visto que una exposición prolongada a los AGs consigue respuesta mucho más prolongadas en el tiempo y estimula la formación de memoria inmune contra éste. (79)

### **Otros tipos de nanopartículas**

- Emulsiones (5)

Este tipo de formulación se caracteriza por ser una mezcla de dos tipos de sustancias inmiscibles (fase oleosa más fase acuosa) que se juntan gracias a la presencia de un emulgente. Se pueden clasificar las emulsiones en función de la jerarquía de sus fases.

- A/O

- O/A.

MF59<sup>TM</sup>: uso como adyuvante (seguro). Estudio en vacuna Influenza

- Ambos

Montanide<sup>TM</sup> (ISA 51, ISA 70): en estudio en vacuna contra la malaria

En el estudio también se añade a la emulsión péptidos-proteínas autoensamblantes, PEG (consigue que la NP evada fagocitosis por macrófagos para que pueda llegar hasta la diana) e Ig específico de determinado receptor de las células dendríticas. El objetivo de esta NP son las DCs.

## **6. Conclusiones**

La vacunación está demostrando ser la principal causa de prevención de muertes provocadas por enfermedades infecciosas. La causa de ello es que con el tiempo los tratamientos que hay contra los patógenos que las producen evolucionan y adquieren resistencias a un ritmo mayor que la capacidad humana para diseñar nuevos antibióticos



y antivirales. A causa de esto, ya que la curación cada vez es más difícil y no siempre inocua, la prevención es la opción más valorada. No obstante, el diseño de vacunas no es fácil y determinados patógenos están resultando un verdadero reto. Algunos de estos patógenos son *M. tuberculosis*, *H. pylori*, *S. aureus*, y *C. trachomatis*, y aunque el desarrollo de vacunas formadas a partir de nanopartículas abre nuevas vías, hay todavía camino por recorrer. El desarrollo de las nanopartículas y su aplicación en las vacunas es, en muchos aspectos, un mundo nuevo que explorar y el que sea tan reciente hace que todavía haya relativamente pocas formulaciones en estudio y aún menos en el mercado. No obstante, el rápido avance de la ciencia y la tecnología, y el gran interés económico que suponen estas nuevas formulaciones hacen suponer que con el paso del tiempo el número de vacunas formadas por nanopartículas no hará más que aumentar ya que suponen un avance revolucionario. No obstante, la introducción de las nanopartículas no se quedará solamente en las vacunas, ya hay estudios de sus aplicaciones en tratamientos antibióticos y antitumorales. En definitiva, en unos años se avecina una revolución en el mundo de la medicina cuando terminen los ensayos clínicos de las vacunas de nanopartículas.

## 7. Bibliografía

- (1) Leon Chien-Wei Lin, Saborni Chattopadhyay, Jung-Chen Lin, and Che-Ming Jack Hu. *Adv. Healthcare Mater*, **2018**, 7. Advances and Opportunities in Nanoparticle- and Nanomaterial-Based Vaccines against Bacterial Infections. DOI: 10.1002/adhm.201701395
- (2) Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine* 2010;28(Suppl 3):C25-36.
- (3) Zhu M., Wang R. & Nie G. Applications of nanomaterials as vaccine adjuvants, *Human Vaccines & Immunotherapeutics, Methods*, **2014**, 10, 2761. DOI: 10.4161/hv.29589
- (4) Coffman RL, Sher A, Seder RA. *Immunity*, **2010**, 3, 492. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work.
- (5) Zhao L, Seth A, Wibowo N, Zhao CX, Mitter N, Yu C, Middelberg AP. *Elsevier* **2014** 9;32. Nanoparticle vaccines. DOI: 10.1016/j.vaccine.2013.11.069.
- (6) Treuel L, Jiang X, Nienhaus GU. New views on cellular uptake and trafficking of manufactured nanoparticles. *Journal of the Royal Society Interface*, **2013**, 10, 20120939.
- (7) Ferreira S.A., Gama F.M., Vilanova M. *Nanomedicine NBM* **2013**, 9, 159. Polymeric nanogels as vaccine delivery systems.
- (8) Zolnik BS, Gonzalez-Fernandez A, Sadrieh N, Dobrovolskaia MA. *Endocrinology*, **2010**, 151, 458. Minireview: nanoparticles and the immune system.
- (9) Z. Wang, K. Dong, Z. Liu, Y. Zhang, Z. Chen, H. Sun, J. Ren, X. Qu, *Biomaterials* **2017**, 113, 145.
- (10) Nguyen D, Green J, Chan J, Langer R, Anderson D. *Adv Mater*, **2009**, 21:847. Polymeric materials for gene delivery and DNA vaccination.
- (11) Shen H, Ackerman AL, Cody V, Giodini A, Hinson ER, Cresswell P, et al. *Immunology* **2006**, 117, 78. Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles.
- (12) Wang X, Uto T, Akagi T, Akashi M, Baba M. *J Virol* **2007**, 81, 10009. Induction of potent CD8+ T-cell responses by novel biodegradable nanoparticles carrying human immunodeficiency virus type 1 gp120.

- (13) Reddy ST, van der Vlies AJ, Simeoni E, Angeli V, Randolph GJ, O'Neil CP, et al. *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 1159. Exploiting lymphatic transport and complement activation in nanoparticle vaccines.
- (14) Cone RA. *Adv Drug Deliv Rev*, **2009**, *61*, 75-85. Barrier properties of mucus.
- (15) Conway MA, Madrigal-Estebas L, McClean S, Brayden DJ, Mills KH. *Vaccine*, **2001**, *19*, 1940. Protection against *Bordetella pertussis* infection following parenteral or oral immunization with antigens entrapped in biodegradable particles: effect of formulation and route of immunization on induction of Th1 and Th2 cells.
- (16) Gutierrez I, Hernández RM, Igartua M, Gascón AR, Pedraz JL. *Vaccine*, **2002**, *21*, 67. Sizedependent immune response after subcutaneous, oral and intranasal administration of BSA-loaded nanospheres.
- (17) Wendorf J, Chesko J, Kazzaz J, Ugozzoli M, Vajdy M, O'Hagan D, et al. *Hum Vaccin*, **2008**; *4*, 44. A comparison of anionic nanoparticles and microparticles as vaccine delivery systems.
- (18) Doshi N, Mitragotri S. *Adv Funct Mater*, **2009**, *19*, 3843. Designer biomaterials for nanomedicine.
- (19) Sharma S, Mukkur TK, Benson HA, Chen Y. *J Pharm Sci*, **2009**, *98*, 812. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems.
- (20) Kumar M, Behera AK, Lockey RF, Zhang J, Bhullar G, De La Cruz CP, et al. *Hum Gene Ther*, **2002**, *13*, 1415. Intranasal gene transfer by chitosan-DNA nanospheres protects BALB/c mice against acute respiratory syncytial virus infection.
- (21) Sayin B, Somavarapu S, Li XW, Sesardic D, Senel S, Alpar OH. *Eur J Pharm Sci*, **2009**, *38*, 362. TCMCC (N-trimethyl chitosan–mono-N-carboxymethyl chitosan) nanocomplexes for mucosal delivery of vaccines.
- (22) Foged C, Brodin B, Frokjaer S, Sundblad A. *International Journal of Pharmaceutics*, **2005**, *298*, 315. Particle size and surface charge affect particle uptake by human dendritic cells in an in vitro model.
- (23) Singh J, Pandit S, Bramwell VW, Alpar HO. *Methods*, **2006**, *38*, 96. Diphtheria toxoid loaded poly-( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems.
- (24) Singh J, Pandit S, Bramwell VW, Alpar HO. *Methods* **2006**, *38*, 96. Diphtheria toxoid loaded poly-( $\epsilon$ -caprolactone) nanoparticles as mucosal vaccine delivery systems.
- (25) Cruz LJ, Tacke PJ, Fokink R, Figdor CG. *Biomaterials* **2011**, *32*, 6791. The influence of PEG chain length and targeting moiety on antibody-mediated delivery of nanoparticle vaccines to human dendritic cells.
- (26) Mody KT, Papat A, Mahony D, Cavallaro AS, Yu C, Mitter N. *Nanoscale*, **2013**, *5*, 5167. Mesoporous silica nanoparticles as antigen carriers and adjuvants for vaccine delivery.
- (27) He Q, Mitchell AR, Johnson SL, Wagner-Bartak C, Morcol T, Bell SJD. *Immunology*, **2000**, *7*, 899. Calcium phosphate nanoparticle adjuvant. Clinical and Diagnostic Laboratory.
- (28) Slütter B, Soema PC, Ding Z, Verheul R, Hennink W, Jiskoot W. *Journal of Controlled Release*, **2010**, *143*, 207. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen.
- (29) T. N. Ellis, M. J. Kuehn, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **2010**, *74*, 81. Virulence and immunomodulatory roles of bacterial outer membrane vesicles.
- (30) O. Koeberling, E. Ispasanie, J. Hauser, O. Rossi, G. Pluschke, D. A. Caugant, A. Saul, C. A. MacLennan, *Vaccine* **2014**, *32*, 2688. A broadly-protective vaccine against meningococcal disease in sub-Saharan Africa based on generalized modules for membrane antigens (GMMA).
- (31) J. A. Rosenthal, C. Huang, A. M. Doody, T. Leung, K. Mineta, D. D. Feng, E. C. Wayne, N. Nishimura, C. Leifer, M. P. DeLisa, S. Mendez, D. Putnam, *PLoS One* **2014**, *9*, 1. Mechanistic insight into the TH1-biased immune response to recombinant subunit vaccines delivered by probiotic bacteria-derived outer membrane vesicles.

- (32) L. Fantappiè, M. de Santis, E. Chiarot, F. Carboni, G. Bensi, O. Jousson, I. Margarit, G. Grandi, J. Extracell. *Vesicles* **2014**, *3*, 24015. Antibody-mediated immunity induced by engineered Escherichia coli OMVs carrying heterologous antigens in their lumen.
- (33) Sharma S, Mukkur T, Benson HA, Chen Y. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2009**, *98*, 812–43. Pharmaceutical aspects of intranasal delivery of vaccines using particulate systems.
- (34) G. Bozzuto, A. Molinari, *Int. J. Nanomed.*, **2015**, *10*, 975. Liposomes as nanomedical devices.
- (35) Marasini N., Ghaffar K. A., Skwarczynski M., Toth I., *Elsevier*, **2017**, *2*, 221 Micro and Nanotechnology in Vaccine Development.
- (36) D. Dhanasooraj, R. Ajay Kumar, S. Mundayoor, R. A. Kumar, S. Mundayoor, *Int. J. Nanomed.*, **2013**, *8*, 835. Vaccine delivery system for tuberculosis based on nano-sized hepatitis B virus core protein particles.
- (37) Andre FE. *Vaccine*, **1990**, *8*, 74. Overview of a 5-year clinical-experience with a yeast-derived hepatitis-B vaccine.
- (38) Cutts FT, Franceschi S, Goldie S, Castellsague X, de Sanjose S, Garnett G, et al. *Bulletin of the World Health Organization*, **2007**, *85*, 7 19. Human papillomavirus and HPV vaccines: a review.
- (39) Bin Park S. *Nature* **2012**, *491*, 21. Hepatitis E vaccine debuts.
- (40) J. Denis, E. Acosta-Ramirez, Y. Zhao, M.-E. Hamelin, I. Koukavica, M. Baz, et al. *Vaccine*, **2008**, *26*, 3395. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform.
- (41) I. Yamashita, K. Iwahori, S. Kumagai, *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1800*, 846. Functional ferritin nanoparticles for biomedical applications.
- (42) Kanekiyo M, Wei C-J, Yassine HM, McTamney PM, Boyington JC, Whittle JR, et al. *Nature* **2013**, *499*, 102. Self-assembling influenza nanoparticle vaccines elicit broadly neutralizing H1N1 antibodies.
- (43) C. I. Champion, V. A. Kickhoefer, G. Liu, R. J. Moniz, A. S. Freed, L. L. et al. *PLoS One* **2009**, *4*, e5409. A Vault Nanoparticle Vaccine Induces Protective Mucosal Immunity.
- (44) S. A. Kaba, M. E. McCoy, T. A. P. F. Doll, C. Brando, Q. Guo, D. Dasgupta, Y. Yang, et al. *PLoS One* **2012**, *7*, e48304. Protective Antibody and CD8+ T-Cell Responses to the Plasmodium falciparum Circumsporozoite Protein Induced by a Nanoparticle Vaccine.
- (45) J. S. Rudra, Y. F. Tian, J. P. Jung, J. H. Collier, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 622. Self-assembled peptide nanofibers raising durable antibody responses against a malaria epitope.
- (46) M. Zaman, M. F. Good, I. Toth, *Methods* **2013**, *60*, 226. Nanovaccines and their mode of action.
- (47) A. S. Tyne, J. G. Y. Chan, E. R. Shanahan, I. Atmosukarto, H.-K. Chan, W. J. Britton, N. P. West, *Vaccine*, **2013**, *31*, 4322. PLGA particulate subunit tuberculosis vaccines promote humoral and Th17 responses but do not enhance control of Mycobacterium tuberculosis infection.
- (48) M. Zaman, M. F. Good, I. Toth, *Methods*, **2013**, *60*, 226. Nanovaccines and their mode of action.
- (49) K. Niikura, T. Matsunaga, T. Suzuki, S. Kobayashi, H. Yamaguchi, Y. Orba, A. Kawaguchi, H. Hasegawa, K. Kajino, T. Ninomiya, K. Ijiri, H. Sawa, *ACS Nano*, **2013**, *7*, 3926. Gold nanoparticles as a vaccine platform: influence of size and shape on immunological responses in vitro and in vivo.
- (50) E. Rodriguez-Del Rio, M. Marradi, R. Calderon-Gonzalez, E. Frande-Cabanes, S. Penadés, N. Petrovsky, C. Alvarez-Dominguez, *Vaccine* **2015**, *33*, 1465. A gold Glyco-nanoparticle carrying a listeriolysin 0 peptide and formulated with Advax delta inulin adjuvant induces robust T-cell protection against listeria infection.
- (51) B. D. Chithrani, W. C. W. Chan, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 1542. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes.

- (52) F. Danhier, E. Ansorena, J. M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Pr at, J. *Controlled Release* **2012**, *161*, 505. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications.
- (53) M. Rincon-Restrepo, A. Mayer, S. Hauert, D. K. Bonner, E. A. Phelps, J. A. Hubbell, et al. *Biomaterials* **2017**, *132*, 48. Vaccine nanocarriers: Coupling intracellular pathways and cellular biodistribution to control CD4 vs CD8 T cell responses.
- (54) J. A. Rosenthal, C. Huang, A. M. Doody, T. Leung, K. Mineta, D. D. Feng, E. C. Wayne, et al. *PLoS One* **2014**, *9*, 1. Mechanistic insight into the TH1-biased immune response to recombinant subunit vaccines delivered by probiotic bacteria-derived outer membrane vesicles.
- (55) Thomas C, Rawat A, Hope-Weeks L, Ahsan F. *Molecular Pharmaceutics* **2011**; *8*: 405. Aerosolized PLGA nanoparticles enhance humoral, mucosal and cytokine responses to hepatitis B vaccine.
- (56) S. L. Demento, W. Cui, J. M. Criscione, E. Stern, J. Tulipan, S. M. Kaech, T. M. Fahmy, *Biomaterials* **2012**, *33*, 4957. Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype.
- (57) F. Azmi, A. A. H. Ahmad Fuaad, A. K. Giddam, M. R. Batzloff, M. F. Good, M. Skwarczynski, I. Toth, *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22*, 6401. Self-adjuvanting vaccine against group A streptococcus: Application of fibrillized peptide and immunostimulatory lipid as adjuvant.
- (58) S.-S. Huang, I.-H. Li, P.-D. Hong, M.-K. Yeh, *Int. J. Nanomed.* **2014**, *9*, 813. Biodegradable polymeric microsphere-based vaccines and their applications in infectious diseases
- (59) Hamdy S, Molavi O, Ma Z, Haddadi A, Alshamsan A, Gobti Z, et al. *Vaccine* **2008**;26:5046. Co-delivery of cancer-associated antigen and Toll-like receptor 4 ligand in PLGA nanoparticles induces potent CD8+ T cell-mediated antitumor immunity.
- (60) Chong CSW, Cao M, Wong WW, Fischer KP, Addison WR, Kwon GS, et al. *J Control Release* **2005**;102:85. Enhancement of T helper type 1 immune responses against hepatitis B virus core antigen by PLGA nanoparticle vaccine delivery.
- (61) Bivas-Benita M, Lin MY, Bal SM, van Meijgaarden KE, Franken KLMLC, Friggen AH, et al. *Vaccine* **2009**;27:4010. Pulmonary delivery of DNA encoding *Mycobacterium tuberculosis* latency antigen Rv1733c associated to PLGAPEI nanoparticles enhances T-cell responses in a DNA prime/protein boost vaccination regimen in mice.
- (62) Lamalle-Bernard D, Munier S, Compagnon C, Charles MH, Kalyanaraman VS, Delair T, et al. *J Control Release* **2006**,115,57. Coadsorption of HIV-1 p24 and gp120 proteins to surfactant-free anionic PLA nanoparticles preserves antigenicity and immunogenicity.
- (63) Westwood A, Elvin SJ, Healey GD, Williamson ED, Eyles JE. *Vaccine* **2006**,24,1736. Immunological responses after immunisation of mice with microparticles containing antigen and single-stranded RNA (polyuridylic acid).
- (64) Vila A, Sánchez A, Pérez C, Alonso MJ. *Polym Adv Technol* **2002**, *13*, 851. PLA-PEG nanospheres: new carriers for transmucosal delivery of proteins and plasmid DNA.
- (65) Uto T, Wang X, Sato K, Haraguchi M, Akagi T, Akashi M, et al. *J Immunol* **2007**,178,2979. Targeting of antigen to dendritic cells with poly(gamma-glutamic acid) nanoparticles induces antigen-specific humoral and cellular immunity.
- (66) L. Zhang, Z. Zeng, C. Hu, S. L. Bellis, W. Yang, Y. Su, X. Zhang, Y. Wu. *Biomaterials* **2016**, *77*, 307. Controlled and targeted release of antigens by intelligent shell for improving applicability of oral vaccines.
- (67) Yang J, Li ZH, Zhou JJ, Chen RF, Cheng LZ, Zhou QB, et al. *Chin J Cancer* **2010**, *29*, 359. Preparation and antitumor effects of nanovaccines with MAGE-3 peptides in transplanted gastric cancer in mice.
- (68) Danesh-Bahreini MA, Shokri J, Samiei A, Kamali-Sarvestani E, Barzegar-Jalali M, Mohammadi-Samani S. *Int J Nanomed* **2011**, *6*, 835. Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan

nanoparticles containing Leishmania superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice.

- (69) Borges O, Cordeiro-da-Silva A, Tavares J, Santarem N, de Sousa A, Borchard G, et al. *Eur J Pharm Biopharm* **2008**;69:405. Immune response by nasal delivery of hepatitis B surface antigen and codelivery of a CpG ODN in alginate-coated chitosan nanoparticles.
- (70) Prego C, Paolicelli P, Diaz B, Vicente S, Sanchez A, Gonzalez-Fernandez A, et al. *Vaccine* **2010**, 28, 2607. Chitosan-based nanoparticles for improving immunization against hepatitis B infection.
- (71) Amidi M, Romeijn SG, Verhoef JC, Junginger HE, Bungener L, Huckriede A, et al. *Vaccine* **2007**, 25, 144. N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in a mouse model.
- (72) Chen F, Zhang Z-R, Yuan F, Qin X, Wang M, Huang Y. *Int J Pharm* **2008**, 349, 226. In vitro and in vivo study of N-trimethyl chitosan nanoparticles for oral protein delivery.
- (73) Slütter B, Soema PC, Ding Z, Verheul R, Hennink W, Jiskoot W. *J Control Release* **2010**, 143, 207. Conjugation of ovalbumin to trimethyl chitosan improves immunogenicity of the antigen.
- (74) Shiku H, Wang L, Ikuta Y, Okugawa T, Schmitt M, Gu X, et al. *Cancer Chemother Pharm* **2000**, 46(Suppl), S77. Development of a cancer vaccine: peptides, proteins, and DNA.
- (75) Hasegawa K, Noguchi Y, Koizumi F, Uenaka A, Tanaka M, Shimono M, et al. *Clin Cancer Res* **2006**, 12, 1921. In vitro stimulation of CD8 and CD4 T cells by dendritic cells loaded with a complex of cholesterol-bearing hydrophobized pullulan and NY-ESO-1 protein: identification of a new HLA-DR15-binding CD4 T-cell epitope.
- (76) Oh JK, Lee DI, Park JM. *Prog Polym Sci* **2009**, 34, 1261. Biopolymer-based microgels/nanogels for drug delivery applications.
- (77) Hubbell JA, Thomas SN, Swartz MA. *Nature* **2009**, 462, 449. Materials engineering for immunomodulation.
- (78) Bal SM, Slütter B, van Riet E, Kruithof AC, Ding Z, Kersten GF, et al. *J Control Release* **2010**, 142, 374. Efficient induction of immune responses through intradermal vaccination with N-trimethyl chitosan containing antigen formulations.
- (79) Amidi M, Romeijn SG, Verhoef JC, Junginger HE, Bungener L, Huckriede A, et al. *Vaccine* **2007**, 25, 144. N-trimethyl chitosan (TMC) nanoparticles loaded with influenza subunit antigen for intranasal vaccination: biological properties and immunogenicity in a mouse model.
- (80) Sivaram A. J., Wardiana A., Howard C. B., Mahler S. M., Thurecht K. J. *Adv. Healthcare Mater.* **2018**, 7, 1700607. Recent Advances in the Generation of Antibody–Nanomaterial Conjugates.