



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**VACUNAS BASADAS EN PARTÍCULAS  
SIMILARES A VIRUS (VLPs)**

Autora: María García González

Fecha: Junio 2019

Tutor: Humberto Martín Brieva

# ÍNDICE

<b>RESUMEN .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES .....</b>	<b>2</b>
I.    PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS RECOMBINANTES .....	2
I.I. VACUNAS BASADAS EN PARTÍCULAS SIMILARES A VIRUS (VLPs).....	3
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>4</b>
<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>5</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>5</b>
I.    VACUNAS VLP COMERCIALIZADAS.....	5
II.   PRODUCCIÓN DE VACUNAS BASADAS EN VLPs .....	9
III.  ADYUVANTES UTILIZADOS EN VACUNAS VLP.....	13
IV.  FUTURO DE LAS VACUNAS VLP.....	15
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>18</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>19</b>

## RESUMEN

Las partículas similares a virus (VLPs) son complejos multiméricos de proteínas víricas estructurales, producidos mediante tecnología del ADN recombinante, que se ensamblan espontáneamente durante el ciclo viral o en sistemas heterólogos durante la expresión de la proteína viral, ya que pertenecen a la cápsida de los virus. Son por ello proteínas terapéuticas recombinantes, ya que se producen a partir de organismos vivos. Se han generado vacunas recombinantes a partir de estas partículas, cuya investigación y desarrollo se ha visto incrementado en las últimas tres décadas, debido a sus características inmunológicas favorables. Actualmente existen dos tipos de vacunas VLP, con o sin envoltura, mimetizando al virus nativo.

Para producir estas vacunas, se deben seguir una serie de etapas complejas hasta llegar al producto final: expresión de la proteína, clarificación, concentración, caracterización y formulación. Además, antes de comenzar el proceso se debe elegir minuciosamente el sistema heterólogo más conveniente para la producción de cada una de ellas, así como las diferentes herramientas tecnológicas que se utilizarán para la purificación y caracterización.

Estas vacunas empezaron a comercializarse en 1986, año en el cuál se aprobó la primera vacuna VLP contra el virus de la hepatitis B. Actualmente, hay aproximadamente 20 vacunas comercializadas frente: al virus del papiloma humano, hepatitis E, al virus de la gripe, de la varicela zóster, e incluso la primera candidata como vacuna VLP frente a la malaria (Mosquirix™), así como muchas otras que están actualmente en desarrollo.

## INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

### I. Proteínas terapéuticas recombinantes

Las proteínas recombinantes son productos terapéuticos generados a partir tecnologías que incluyen organismos vivos (1). Han supuesto un gran avance para el tratamiento de muchas enfermedades, siendo oncología, hematología y las alteraciones metabólicas las áreas médicas en las que más dinero se invierte en investigación actualmente (2,3). Sin embargo, también se utilizan para el desarrollo de vacunas recombinantes, producción de hormonas, enzimas, citoquinas y proteínas híbridas de fusión (4). Concretamente, las vacunas basadas en partículas similares a virus (VLPs = *virus like particles*), son vacunas recombinantes que se generan a partir de proteínas terapéuticas, que actualmente se utilizan no solo en vacunación sino también en terapia contra el cáncer y como sistemas de administración de fármacos (3).

Y es que, desde la aprobación de la insulina en 1982, se han desarrollado cerca de 650 medicamentos de proteínas en todo el mundo, de los cuales unos 400 son productos proteicos recombinantes, disponibles como opciones terapéuticas frente a diferentes enfermedades. Además, más de mil están en desarrollo, lo que hace pensar que en unos años el número de biofármacos comercializados aumente considerablemente (1,4).

Las proteínas humanas de interés farmacéutico podrían ser comercializadas con fines terapéuticos si no hubiese dificultades a la hora de aislarlas de su fuente natural. Sin embargo, la limitación en la disponibilidad de fluidos, tejidos y órganos humanos; la escasa cantidad producida por el organismo humano de manera fisiológica; y la presencia de contaminantes peligrosos para la salud (bacterias, virus) ha hecho que se desarrollen ampliamente los procedimientos biotecnológicos. Gracias al desarrollo de la ingeniería genética, podemos obtener proteínas recombinantes a gran escala utilizando sistemas celulares heterólogos, es decir, que son distintos a los organismos productores originales.

La utilización de las proteínas recombinantes como productos terapéuticos está siendo cada vez más extendida, facilitando el acercamiento tanto terapéutico como diagnóstico a numerosas patologías que amenazan la vida, incluyendo la diabetes (insulina), la enfermedad renal terminal (eritropoyetina), la hepatitis viral (interferón), trastornos de la coagulación (factor VII, VIII, IX) (1).

En un inicio se pensaba que el principal objetivo de la producción de estas proteínas era conseguir una copia exacta a la original, es decir, a la del ser humano, no siendo así actualmente, ya que muchas de las modificaciones que surgen en el proceso de producción permiten obtener ventajas terapéuticas. Sin embargo, los cambios relativamente menores en la fabricación pueden afectar a la seguridad de las proteínas terapéuticas. De hecho, al igual que ocurre con otros fármacos, la eficacia y la seguridad debe evidenciarse en ensayos clínicos, al igual que debe demostrarse el posicionamiento frente a otras terapias disponibles (2).

### ***1.1. Vacunas basadas en partículas similares a virus (VLPs)***

Las vacunas siguen siendo la intervención más rentable y exitosa para controlar y prevenir las enfermedades infecciosas (5,6). Hasta la década de 1980, la gran mayoría de las vacunas virales preventivas consistían en vacunas tradicionales, es decir, con virus atenuados o inactivados, que se administraban para generar una respuesta inmune protectora. Ambas estrategias han demostrado una buena eficacia, y generalmente no se requiere una segunda administración o el uso de adyuvantes. Esto se debe a que incluyen: 1) la capacidad de replicación de los virus atenuados, 2) una geometría repetitiva en la superficie y 3) la capacidad de estimular respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas.

En general, la población suele tolerar bien las vacunas tradicionales, sin embargo las vacunas atenuadas presentan un riesgo mayor que las inactivadas, ya que puede revertirse el virus a una forma patógena, siendo de especial riesgo los individuos inmunocomprometidos y los productores de estas vacunas. Es por esto, que se utilizan esas limitaciones para seguir avanzando en el desarrollo de productos que solventen esos problemas (Figura 1).

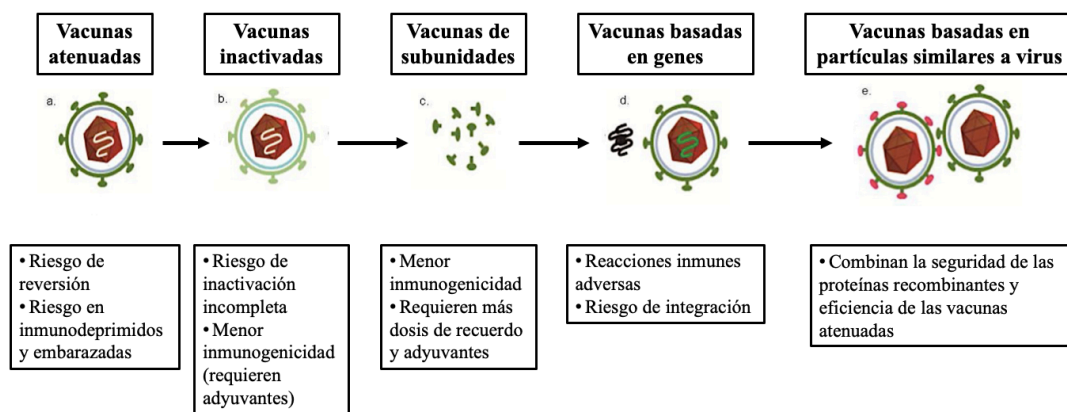


Figura 1. Evolución de los diferentes tipos de vacunas (adaptado de (7))

Las vacunas de última generación mejoran la seguridad al eliminar los virus completos de la formulación y en su lugar, utilizan subunidades de proteínas, ADN o partículas similares a virus (VLPs). Pero su mayor seguridad hace que tengan una menor inmunogenicidad, por lo que para promover la inducción eficiente de respuestas inmunes, es necesario agregar adyuvantes (7,8).

Las vacunas de partículas similares a virus (VLPs) son complejos multiméricos de proteínas víricas estructurales, producidos mediante tecnología de ADN recombinante, que se ensamblan espontáneamente durante el ciclo viral o en sistemas heterólogos durante la expresión de la proteína viral debido a que pertenecen a la cápsida de los virus. Además, carecen de material genómico, evitándose cualquier posibilidad de reversión o infección (3,7,9). No pueden replicarse en el receptor, pero estimulan el sistema inmunológico mediante el reconocimiento de subunidades repetitivas, lo que produce una respuesta inmunitaria celular y humoral elevada. Debido a las ventajas en comparación con otros tipos de vacunas, el interés en la tecnología VLP ha aumentado en los últimos años (6,8).

Las proteínas de la cápsida de un virus están compuestas por subunidades de proteínas idénticas llamadas capsómeros. Estos son capaces de autoensamblarse para formar la cápsida, pudiéndose colocar de diferentes formas: icosaédrica o helicoidal.

Los capsómeros pueden unirse con el material genético en el interior, o bien sin él y formar una cápsida vacía, que es lo que conocemos como las partículas similares a virus. Además, mantienen el tropismo e imitan la estructura de los virus nativos pudiendo ser por ello, con o sin envoltura (Figura 2).

Las VLPs envueltas reciben su envoltura (membrana lipídica) de la célula huésped donde se expresan. Pueden tener incluidas en esa bicapa lipídica una o varias proteínas distintas, siendo estas el antígeno inmunológico objetivo para generar anticuerpos neutralizantes en el organismo donde se administran. Las VLPs del virus de la gripe son posiblemente las VLPs envueltas más estudiadas, formadas por proteínas de la matriz M1 y con las glicoproteínas hemaglutinina (HA) y/o neuraminidasa (NA) incluidas en la bicapa lipídica. También se incluyen en este grupo las VLPs del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y del virus del ébola (10).

Varios tipos de células de mamíferos son adecuados para la producción de este tipo de vacunas. Es cierto que producen niveles más bajos de la proteína de interés en comparación con otros sistemas, pero tienen la capacidad de producir modificaciones postraduccionales más complejas y precisas. Por esta razón se utilizan para producir VLPs envueltas complejas compuestas de múltiples proteínas estructurales (7).

En cambio, en las VLPs sin envoltura la capa lipídica está ausente. La inserción de antígenos heterólogos en este tipo de VLPs se logra principalmente a través de la fusión genética o la conjugación química. Algunos ejemplos de VLPs no envueltas utilizados para expresar antígenos extraños son HBcAg y HPV L1, entre otros (9). Aquellos que presentan solo una proteína de la cápsida pueden producirse en sistemas de expresión procarióticos y eucarióticos. En cambio, aquellas con múltiples proteínas de cápsida son más complejas, por lo que se utilizan sistemas eucarióticos superiores como levaduras, células de insecto, e incluso plantas, que permiten la coexpresión de las diferentes proteínas y el complejo de ensamblaje dentro de la célula (10).

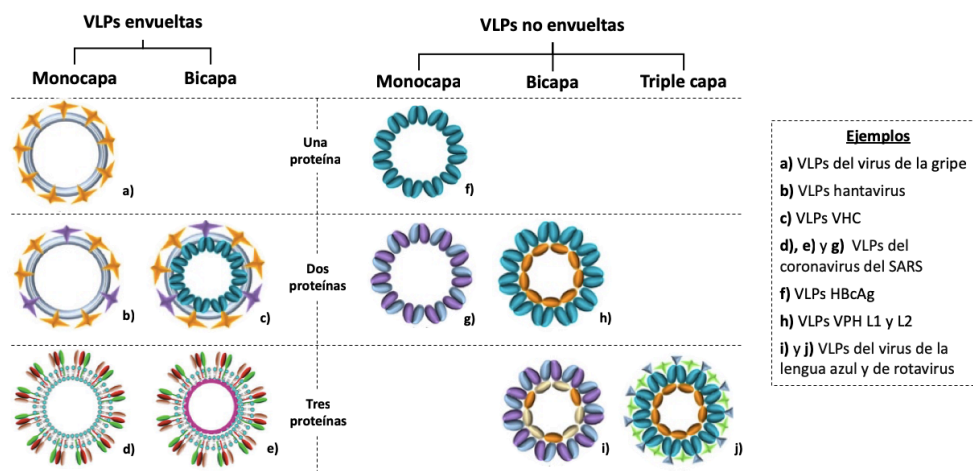


Figura 2. Clasificación de diferentes VLPs en función del número de proteínas superficiales virales y la presencia o no de envoltura (adaptado de (10,11))

## OBJETIVOS

Los objetivos propuestos en este trabajo son los siguientes:

- Conocer qué son las VLPs, sus tipos y sus aplicaciones.
- Comparar las vacunas de última generación (VLPs) frente a las tradicionales, y conocer sus ventajas.
- Desarrollar cada una de las etapas que conllevan la producción de las vacunas VLP.
- Revisión de las diferentes vacunas VLP comercializadas.
- Conocer los distintos adyuvantes utilizados en la formulación de estas vacunas.
- Perspectivas de futuro de las VLPs: revisión de los últimos estudios e investigaciones de VLPs que se encuentran actualmente en ensayos clínicos.

## METODOLOGÍA

El método de búsqueda bibliográfica empleado para la adquisición de documentos válidos y relevantes ha sido a través de descriptores en la literatura científica como: *virus-like particles*, *VLP vaccines*, *VLP drug vectors*, *HBV VLP*, *production of virus-like particles*, *VLP adjuvants* en las bases de datos: Pubmed y Google Académico. Además, se ha realizado una búsqueda manual para la obtención de datos concretos de índole teórica.

Tras la búsqueda, se han seleccionado las publicaciones teniendo en cuenta determinados criterios de inclusión y exclusión:

- Criterios de inclusión: con resumen y/o texto completo disponible, y fecha de publicación en los últimos 15 años. En cuanto al tipo de artículos, fueron seleccionados los originales y las revisiones.
- Criterios de exclusión: resumen no disponible, revisiones previas a los últimos 15 años.

En el marco teórico que se expone a continuación se mostrarán los principales hallazgos obtenidos tras la lectura crítica de la bibliografía consultada.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I. Vacunas VLP comercializadas

Las VLPs han hecho grandes avances en las últimas tres décadas debido a sus características inmunológicas, como su tamaño, la geometría repetitiva de la superficie y la capacidad de inducir respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. Varias vacunas VLP están disponibles en el mercado, y otras están actualmente en desarrollo (6,12). Para conocer más en detalle las vacunas VLP comercializadas veremos algunas de sus características: proteínas antigénicas, en qué sistema de expresión se producen, adyuvantes de su formulación, tipos de VLP, año y lugar de autorización.

- *Vacunas VLP frente al virus de la hepatitis B (VHB)*

Las vacunas contra la hepatitis B fueron las primeras vacunas basadas en VLP comercializadas (1986) para uso humano. El VHB es un virus de ADN de 42 nm de la familia *Hepadnaviridae* que se replica en el hígado y puede causar disfunción hepática, cirrosis y cáncer en portadores crónicos. Es un virus envuelto, con una cápsida que contiene el ADN circular viral y la ADN polimerasa. La envoltura del virus presenta tres proteínas, codificadas por el gen S: la proteína pequeña o antígeno de superficie (HBsAg); la proteína mediana que comprende la proteína S con una extensión amino-terminal (pre-S2); y la proteína grande que comprende la proteína media y una extensión amino-terminal (pre-S1). El núcleo interno presenta el antígeno del core (HBcAg), y el antígeno E (HBeAg) (7,12,13).

La vacunación ha demostrado ser la medida más eficaz para prevenir enfermedades causadas por este virus. Las vacunas recombinantes han reemplazaron gradualmente a las vacunas derivadas del plasma, pero siguen conteniendo el HBsAg como antígeno clave (12).

La clonación y expresión del gen S (HBsAg) se logró por primera vez en *Escherichia coli*. Sin embargo, cuando se produjo en bacterias, el antígeno no se secretó, siendo difícil de purificar además de ser no inmunogénico. Con el fin de generar VLPs inmunogénicas, se utilizaron huéspedes de expresión eucarióticos, como levaduras y células de mamíferos. Por ello, las vacunas recombinantes actuales se producen en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Hansenula polymorpha*) o en células de mamíferos, concretamente en células de ovario de hámster chino (CHO) (14). Con estos sistemas de expresión se consiguen VLPs similares a las partículas subvirales de HBsAg altamente inmunogénicas de 22 nm aisladas del plasma de individuos infectados crónicamente con VHB (5).

Las vacunas VLP comercializadas contra el VHB se resumen en la Tabla 1. Todas ellas son del tipo VLPs sin envoltura, pero difieren algo de las VLPs no envueltas típicas debido al alto contenido en lípidos procedentes de la célula huésped, que se ha demostrado que interactúan con el HBsAg, lo que facilita la integridad de la conformación y la antigenicidad.

Las vacunas contra la hepatitis B están disponibles como formulaciones:

- **Monovalentes:** Engerix-B<sup>®</sup>, Fendrix<sup>®</sup>, HBvaxPRO<sup>®</sup>, Heplisav-B<sup>®</sup> y Recombivax HB<sup>®</sup>. Contienen solo un componente antigénico del virus.
- **Polivalentes:** Sci-B-Vac<sup>®</sup>. Contiene distintos tipos antigénicos del virus. Esta es la única vacuna trivalente comercializada que contiene antígenos pre-S1, pre-S2 y S de la hepatitis B. Está aprobada para su uso en Israel y en otros 14 países del este de Asia, pero la empresa VBI Vaccines Inc. inició un ensayo clínico de fase III en 2017, que si tiene éxito permitirá obtener la autorización en EE.UU., Europa y Canadá (15).
- **Combinadas:** Ambirix<sup>®</sup> y Twinrix<sup>®</sup> (bivalentes) para hepatitis A y B; Pediarix<sup>®</sup>: (pentavalente) para difteria, tétanos, *Bordetella pertussis*, hepatitis B y polio; y Hexacima<sup>®</sup>, Hexyon<sup>®</sup>, Infanrix hexa<sup>®</sup> y Vaxelis<sup>®</sup> (hexavalentes) para difteria, tétanos, *B. pertussis*, hepatitis B, *Haemophilus influenzae* tipo b y polio.

Además, todas las vacunas VLP comercializadas frente a este virus presentan adyuvantes en su composición, fundamentalmente de aluminio, aunque dos de ellas contienen otros diferentes: Fendrix<sup>®</sup> (destinada a pacientes adultos con insuficiencia renal) contiene MPL (3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A), además de sulfato hidroxifosfato de aluminio; y Heplisav-B<sup>®</sup> contiene CpG (oligodesoxinucleótidos de citosina fosfoguanosina). Más adelante se desarrollan cada uno de los adyuvantes, comentando la razón de su inclusión en las vacunas y sus mecanismos de acción.

Actualmente se están explorando múltiples áreas de investigación para el desarrollo de vacunas más eficaces contra la hepatitis: nuevos adyuvantes, mejora de la calidad antigénica de la proteína HBsAg, nuevos antígenos como péptidos sintéticos y partículas lipopeptídicas, mutantes de la proteína HBsAg, una secuencia de ADN que contiene parte de VHB y la proteína del núcleo de la hepatitis B HBcAg, rutas alternativas de administración y nuevas formas de dosificación. Y ya se han completado algunos estudios para mejorar algunas de sus características. Entre ellas, la sensibilidad a la congelación, a través de la evaluación de diferentes formulaciones. Se logró mediante la adición de polioles para disminuir el punto de congelación, y estudios recientes sugieren que los disacáridos también podrían usarse con el mismo propósito (12,16).

- Vacunas VLP frente al virus de la hepatitis E (VHE)

El virus de la hepatitis E es un virus de la familia *Hepeviridae*, sin envoltura, de unos 32 nm de diámetro y presenta ARN de cadena sencilla en el interior de la cápsida. No existe una vacuna con licencia en Europa contra este virus. Hecolin<sup>®</sup> es la única vacuna autorizada en todo el mundo (solo en China) para la prevención de la hepatitis E. Se basa en un péptido recombinante de 239 aminoácidos, denominado HEV 239, que corresponde a los aminoácidos 368-606 del marco de lectura abierto 2 (ORF2) que codifica la proteína de la cápsida del VHE. La secuencia de aminoácidos se deriva de una cepa de VHE china genotipo 1. El péptido se expresa en *E. coli*, donde forma cuerpos de inclusión (17). Con esta vacuna se ha descrito más del 87% de protección contra la enfermedad en un período de observación de 4 años para sujetos sanos de entre 16 y 65 años (12,18).

La FDA de Estados Unidos ha aprobado esta vacuna para que comience la etapa de ensayos clínicos en abril de 2019. Se llevará a cabo en la Universidad de Emory en Atlanta, Georgia, y se espera que las pruebas aprobadas por la FDA para la segunda y tercera fase se realicen en un tercer país.

- Vacunas VLP frente al virus del papiloma humano (VPH)

Las vacunas contra el VPH son un ejemplo reciente de vacunas VLP de gran éxito. Hay más de 100 tipos diferentes del VPH, pero no todos ellos ocasionan problemas de salud. Algunos pueden causar problemas como son las verrugas genitales. Otros pueden causar cáncer de cuello uterino, vagina, vulva o ano. La mayoría de estas enfermedades son causadas por los tipos 6, 11, 16 o 18 (19).

Es un virus común (el 80% de las mujeres se encuentran con él en algún momento de sus vidas) y la mayoría de las infecciones son asintomáticas (12). La vacunación resulta en una protección casi completa (>90%), pero solo de los serotipos que componen las vacunas.

Los virus de la familia *Papillomaviridae* están presentes en la piel y la mucosa de diferentes especies animales. El VPH es un virus no envuelto, que contiene dos proteínas (L1 y L2) que forman la cápsida icosaédrica, de aproximadamente 60 nm de diámetro, la cual encierra el ADN circular de doble cadena. La proteína L2 es menos abundante y se encuentra fundamentalmente en el interior de la partícula viral, mientras que la proteína L1 es la principal proteína de la cápsida, formando la capa externa del virus (14).

Actualmente hay tres vacunas VLP comercializadas contra el VPH (Tabla 1): Cervarix<sup>®</sup>, Gardasil<sup>®</sup> y Gardasil9<sup>®</sup>. Están compuestas por la proteína principal de la cápsida L1 de ciertos serotipos del VPH, que son producidas por células en las que se ha introducido un gen (ADN) que hace que produzcan esa proteína L1. Finalmente, las proteínas se ensamblan en partículas pseudovíricas, que son estructuras similares al VPH, de manera que el organismo pueda reconocerlas fácilmente (20).

Todas ellas son vacunas sin envoltura y **polivalentes**: bivalente (Cervarix<sup>®</sup>), tetravalente (Gardasil<sup>®</sup>) y nonavalente (Gardasil9<sup>®</sup>). Se almacenan entre 2-8 °C permaneciendo estables durante más de 3 años, pero son sensibles a la congelación, debido a la presencia de la sal de aluminio (adyuvante), que es sensible al proceso de congelación (12,18,19,21).

Se podrían evaluar enfoques similares a los comentados anteriormente en las vacunas del VHB, pero con las vacunas contra el VPH hasta la fecha no hay estudios publicados. En cuanto a las nuevas vías de administración, se han realizado algunas investigaciones recientes sobre la administración por vía intranasal y oral, pero aún no se han aprobado para uso en humanos (12).

- *Vacunas VLP frente al virus de la varicela-zóster (VVZ)*

Actualmente solo hay una vacuna VLP comercializada (Shingrix<sup>®</sup>) contra el virus de la varicela-zóster, siendo además muy reciente su comercialización (Tabla 1). Es una vacuna recombinante formada por la glicoproteína E, presente en la envoltura del virus. Esta proteína juega un papel crítico en la infectividad del VVZ, ya que está involucrada en la entrada y en la propagación del virus. Estructuralmente, es una glicoproteína transmembrana monomérica, con una región extracelular hidrófila, un dominio transmembrana hidrófobo y una cola citoplásmica C-terminal. La versión truncada de la proteína carece del ancla transmembrana y el dominio carboxi-terminal y, por lo tanto, se secreta en el sobrenadante del cultivo cuando se produce en células CHO. El adyuvante que presenta es el AS01, que se compone de MPL y QS21 (18,19).

- *Vacunas VLP frente al virus de la gripe*

Hay cuatro tipos de virus de la gripe (A, B, C y D), pero los causantes de las epidemias estacionales son los de tipo A y B. Este virus pertenece a la familia *Orthomyxoviridae*. Se caracteriza por presentar genoma de ARN de sentido negativo, monocatenario y segmentado. Además, es un virus envuelto, siendo la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA) las principales glicoproteínas de la superficie viral. El gen de la matriz codifica dos proteínas, la proteína M1, que está involucrada en la propagación viral; y la proteína M2, que es un canal de iones transmembrana involucrado en el desprendimiento del virus después de la entrada.

La proteína M2 ha sido el objetivo del diseño de las vacunas universales, ya que la región externa está altamente conservada en los virus de la gripe humana. La vacuna tradicional contra la gripe es una vacuna inactiva que se fabrica a base de huevo, lo cual tiene aplicaciones limitadas. Por ello, una vacuna basada en VLP es un enfoque novedoso para el tratamiento de la gripe. Pero debido a la variación en las estructuras antigénicas (deriva y cambio de antígenos), las vacunas contra la gripe no se pueden acumular y requieren una fabricación rápida y sensible, especialmente en el caso de eventos pandémicos. Estas vacunas contra la gripe basadas en VLP consisten principalmente en las proteínas hemaglutinina (HA) y neuraminidasa (NA) junto con proteínas de la matriz (M1, M2).



Flublok® es una vacuna VLP tetravalente de hemaglutinina (HA) de cuatro virus de la gripe para inyección intramuscular comercializada en Estados Unidos (Tabla 1). Está indicada en la inmunización activa contra enfermedades causadas por virus de la gripe de subtipo A y tipo B, para su uso en personas de 18 años o más.

Contiene proteínas HA purificadas producidas en una línea celular continua de insectos (*expresSF+*®) que se deriva de las células de *Spodoptera frugiperda* (12,19).

Está estandarizada de acuerdo con los requisitos del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos. Para la temporada de gripe 2018-2019, está formulada para contener 180 mcg de HA por dosis de 0.5 mL, con 45 mcg de HA de cada una de las siguientes 4 cepas del virus: A/Michigan/45/2015 (H1N1), A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2), B/Maryland/15/2016 (un virus similar a B/Colorado/6/2017) y B/Phuket/3073/2013 (19).

TABLA 1. LISTA DE VACUNAS VLP COMERCIALIZADAS					
Nombre de la vacuna	Sistema de expresión	Antígeno	Adyuvante	Laboratorio	Año de aprobación
<b>Frente al virus hepatitis B (VHB)</b>					
<b>Ambirix®</b>	<i>S. cerevisiae</i>	HBsAg S	Al <sub>4</sub> (OHPO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	GSK	2002, U.E.
<b>Engerix-B®</b>			Al(OH) <sub>3</sub>	GSK	1989, EE.UU. 2000, U.E.
<b>Fendrix®</b>			AS04	GSK	2005, U.E.
<b>HBvaxPro®</b>			AlOHPO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	MSD	2001, U.E.
<b>Hepelisav-B®</b>	<i>H. polymorpha</i>		CpG 1018	Dynavax	2017, EE.UU.
<b>Hexacima®</b>			Al(OH) <sub>3</sub>	Sanofi Pasteur	2013, U.E.
<b>Hexyon®</b>			Al(OH) <sub>3</sub>	Sanofi Pasteur	2013, U.E.
<b>Infanrix hexa®</b>	<i>S. cerevisiae</i>		Al <sub>4</sub> (OHPO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	GSK	2000, U.E.
<b>Pediarix®</b>			Sales de aluminio	GSK	2002, EE.UU.
<b>Recombivax HB®</b>			Al(OH) <sub>3</sub>	MSD	1986, EE.UU.
<b>Sci-B-Vac®</b>	CHO	HBsAg S, pre-S1 y pre-S2	Al(OH) <sub>3</sub>	VBI	2009, Israel
<b>Vaxelis®</b>	<i>S. cerevisiae</i>	HBsAg S	AlOHPO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	MCM Vaccine B.V.	20XX, EE.UU. 2016, U.E.
<b>Twinrix® pediátrica</b>			Al <sub>4</sub> (OHPO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	GSK	1997, U.E.
<b>Twinrix® adultos</b>			Al <sub>4</sub> (OHPO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	GSK	1996, U.E. 2001, EE.UU.
<b>Frente al virus hepatitis E (VHE)</b>					
<b>Hecolin®</b>	<i>E. coli</i>	HEV 239	Al(OH) <sub>3</sub>	Xiamen Innovax Biotech Co. Ltd.	2012, China
<b>Frente al virus del papiloma humano (VPH)</b>					
<b>Cervarix®</b>	Baculovirus - <i>Trichoplusia ni</i>	L1 VPH tipo 16 y 18	AS04	GSK	2007, U.E. 2009, EE.UU.
<b>Gardasil®</b>	<i>S. cerevisiae</i>	L1 VPH tipo 6, 11, 16 y 18	AlOHPO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	MSD	2006, U.E. y EE.UU.
<b>Gardasil9®</b>	<i>S. cerevisiae</i>	L1 VPH tipo 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58	AlOHPO <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	MSD	2014, EE.UU. 2015, U.E.
<b>Frente al virus de la varicela-zóster (VVZ)</b>					
<b>Shingrix®</b>	CHO	gE	AS01	GSK	2017, EE.UU. 2018, U.E.
<b>Frente al virus de la gripe</b>					
<b>Flublok®</b>	Baculovirus - <i>Spodoptera frugiperda</i>	HA	-	Protein Sciences Corporation	2013, EE.UU.

Abreviaturas. CHO: células de ovario de hámster chino; Al<sub>4</sub>(OHPO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>: fosfato de aluminio; Al(OH)<sub>3</sub>: hidróxido de aluminio; AlOHPO<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>: sulfato hidroxifosfato de aluminio; MPL: 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A; CpG: oligodesoxinucleótido de citosina fosfoguanosina; AS04: MPL + [Al(OH)<sub>3</sub> o Al<sub>4</sub>(OHPO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>]; gE: glicoproteína E del VVZ; AS01: MPL + QS21 ; HA: hemaglutinina. Información obtenida de (15,17-22)

## II. Producción de vacunas basadas en VLPs

Históricamente, las primeras VLPs recombinantes se obtuvieron a partir de genes de proteínas de cubierta sintetizadas y clonadas a partir del antígeno central del VHB (HBcAg), el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y el virus del mosaico del tabaco (VMT). La primera visualización de las VLPs recombinantes mediante microscopía electrónica se publicó en 1982, la cual demostró que las VLPs de HBcAg no podían distinguirse de las cápsidas que se aislaron de un hígado infectado por el VHB.

Esos primeros estudios establecieron varias reglas básicas para la construcción de VLPs recombinantes: 1) la construcción de VLPs recombinantes se basa en gran medida en varios años de investigación sobre el virus correspondiente; 2) los ácidos nucleicos codificantes necesarios para la proteína y péptidos extraños se pueden obtener sintéticamente a partir de los correspondientes oligonucleótidos; 3) las VLPs pueden obtenerse a partir de hospedadores heterólogos; y 4) las VLPs recombinantes recién construidas tienen ventajas significativas sobre los virus nativos, como su disponibilidad en cantidades casi ilimitadas y propiedades funcionales similares o incluso mejores (23).

A continuación, se desarrollarán cada una de las etapas del proceso de producción de las vacunas VLP, recogidas esquemáticamente en la figura 3.

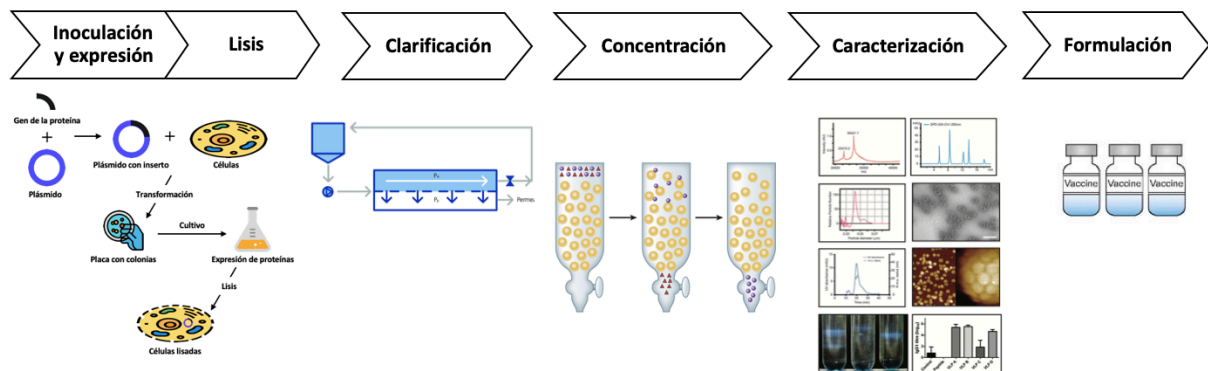


Figura 3. Etapas del proceso de producción de las vacunas basadas en VLPs (adaptado de (10))

Para poder producir correctamente las VLPs es necesario conocer su estructura, ya que esto nos permitirá acelerar su desarrollo. Los métodos computacionales son aceptados casi universalmente como complemento del análisis estructural empírico. Con el avance de la informática, han surgido nuevos enfoques para facilitar la investigación de vacunas como la bioinformática y la predicción de estructuras en 3D. Estas técnicas computacionales se han aplicado en la investigación biológica y en descubrimiento de fármacos, aunque para la investigación de VLPs se encuentra en auge (10). En algunas bases de datos como VIPERdb están recogidas todas las estructuras de cápsidas de virus icosaédricos completadas hasta el momento, en la que actualmente hay 554 registradas. Estas estructuras se han determinado mediante cristalografía de rayos X o microscopía crioelectrónica (24).

- **Etapa 1 – Clonación y expresión de genes virales**

Para la construcción de las VLPs el primer paso es la clonación de los genes estructurales del virus en un vector de expresión adecuado. La secuencia de la proteína estructural viral de interés se puede encontrar en bases de datos, y con ello se puede producir sintéticamente en el laboratorio a partir de los oligonucleótidos correspondientes. Normalmente, todas las VLPs conocidas se derivan de virus que están bien caracterizados, al menos a nivel de secuencia de nucleótidos y organización del genoma (23).

Uno de los factores cruciales en la construcción de VLPs es la selección del sistema de expresión adecuado. Dependiendo de la complejidad de las VLPs, pueden producirse en sistemas procarióticos o eucarióticos, e incluso en algunos casos, ensamblarse en sistemas libres de células (5,25).

Para elegir el sistema correcto, se tienen en cuenta una serie de factores (Tabla 2), incluidos el costo y la necesidad de modificaciones postraduccionales (MPTs), que pueden ser esenciales para generar una respuesta inmune óptima.

TABLA 2. COMPARATIVA DE LOS DIFERENTES SISTEMAS DE EXPRESIÓN					
	<i>E. coli</i>	Levaduras	Células de insecto	Células de mamífero	Plantas
Velocidad de producción	++++	+++	+++	+++	++++
Requerimientos de cultivo	+	+	+++	+++	+++
Rendimiento	++++	+++	++	++	+
Datos de rendimiento	0,75 – 700 mg/ml		0,2 – 18 mg/ml	0,018 – 10 mg/ml	4 – 2380 pg/mg
MPTs	-	++	+++	++++	++++
Coste	+	+	+++	+++	+++

[Datos de rendimiento obtenidos de (10)] (adaptada de (5,7,10))

La primera plataforma de expresión establecida fue *E. coli*, de la cual se conoce ampliamente su fisiología, además de tener requisitos de cultivo simples y un breve período de generación que determina mayor rapidez de cultivo. A pesar de sus desventajas, como su incapacidad para producir proteínas recombinantes con modificaciones postraduccionales, su incapacidad para generar los enlaces disulfuro apropiados, los problemas de solubilidad de las proteínas y la presencia de endotoxinas en las preparaciones de proteínas recombinantes, es una tecnología aceptada que satisface muchos requisitos de investigación e industriales y se ha utilizado ampliamente para la producción de VLPs. Este sistema funcionó bien para la insulina y la hormona de crecimiento humana, pero al conocerse sus limitaciones se recurrió a microorganismos diferentes para evitarlas (1,23).

La glicosilación de proteínas es un proceso de modificación postraducciona l altamente complejo que se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi y que involucra a más de cien proteínas (y genes) diferentes. Esta maquinaria de glicosilación está ausente en *E. coli*, presente pero diferente de las células de mamíferos en *S. cerevisiae*, pero altamente conservada entre las células de mamífero (2).

Desde los primeros experimentos exitosos con la proteína de superficie del VHB, que condujeron a la producción de vacunas profilácticas comerciales contra la hepatitis B y al uso de las VLPs L1 del VPH como una vacuna contra el cáncer cervical, se han utilizado diferentes sistemas de levadura para la construcción de numerosas VLPs (23). Concretamente, la levadura *S. cerevisiae* es otro de los microorganismos más utilizados en el mundo de la biotecnología. Es cierto que los niveles de producción de proteínas recombinantes son menores, pero tiene una ruta secretora similar a la de eucariotas superiores. Y es por esto, que no solo se ha utilizado para la producción de VLPs, si no que han salido al mercado muchos otros productos biofarmacéuticos (somatotropina, insulina) producidos en esta levadura (4).

Un sistema inicialmente exitoso fueron los **baculovirus y líneas celulares de insecto**, especialmente para proteínas orientadas a vacunas. Los baculovirus son virus de insecto no patógenos, y se ha demostrado que son inocuos para los vertebrados y no se pueden replicar en células de mamíferos. Estos sistemas se utilizan ampliamente para la producción de VLPs a escala industrial o de laboratorio debido a una serie de ventajas, como las rápidas tasas de crecimiento, la capacidad para cultivos a gran escala y la capacidad de MPTs de manera similar a las células de mamíferos (23). El sistema puede producir cantidades de proteínas comparables con las obtenidas con bacterias o levaduras, pero su capacidad para realizar MPTs complejos es mayor. La principal desventaja es que los baculovirus envueltos también se producen al mismo tiempo que las VLPs, lo que hace que la purificación sea un paso difícil y costoso (7). Se utilizan tres líneas celulares de insecto para la producción de proteínas recombinantes: Sf9 y Sf21 (*Spodoptera frugiperda*), y células High Five™ (*Trichoplusia ni*). Como ejemplo, destacamos la vacuna VLP Cervarix®, comentada en el apartado anterior, producida a través de este sistema, concretamente con la línea celular de insecto derivada de *Trichoplusia ni*.

Actualmente existen otras plataformas para producir VLPs que evitan el uso de baculovirus, lo que simplifica la purificación. Las **líneas celulares de mamíferos** son el sistema celular de origen animal que prevalece gracias a su capacidad para producir proteínas glicosiladas (26). Sin embargo, los requerimientos nutricionales son complejos, el crecimiento es lento y el tiempo y costos de producción son altos, en comparación con los sistemas microbianos. Debido a esto, las líneas celulares de bacterias y levaduras son las más comunes, constituyendo alrededor de un 50% de las proteínas recombinantes aprobadas para uso humano las producidas en *E. coli* y *S. cerevisiae* (27). También se utilizan en algunos casos sistemas libres de células y plantas transgénicas (*Nicotiana tabacum* y *Arabidopsis thaliana*) (7,23).

Una vez elegido el sistema en el que queremos producir la vacuna, se expanden esas líneas celulares a través de una serie de cultivos en matraces de agitación y se transfieren a un biorreactor, donde se dejan hasta conseguir una densidad celular determinada. A continuación, se inoculará el cultivo con el material genético concreto, cultivándose a la temperatura adecuada para el crecimiento óptimo. Posteriormente el cultivo se centrifuga, eliminando el sobrenadante, y almacenándolo a una temperatura de -60 a -80 °C. Después de la transformación con el plásmido de expresión, se pueden crecer a gran escala antes de la inducción de la expresión de proteínas (28,29).

Para la fermentación, hay **tres sistemas de cultivo diferentes**: por lote (*batch*), lote alimentado (*fed batch*) y cultivo continuo (7).

- En el modo **por lote**, todos los elementos necesarios se agregan al comienzo del cultivo. Esto tiene la ventaja de que el medio está bien utilizado y el producto está muy concentrado. Es el método más utilizado para la producción de VLPs (7,30). Como inconveniente cabe destacar que habrá un crecimiento limitado por la concentración de sustrato que hay en un inicio, además de tener que controlarse exhaustivamente las condiciones del cultivo (temperatura, pH, iones).
- Para extender la fase de crecimiento exponencial, se puede utilizar el modo de **lote alimentado**. Aquí, se agregan pequeñas cantidades de nutrientes o medio durante el cultivo para suministrar a las células componentes específicos que se van agotando. Con esta estrategia se alcanzarán altas concentraciones celulares.
- Y en el modo de **cultivo continuo**, se agrega medio fresco a medida que se extrae el medio ya acondicionado. De esta manera se obtiene una producción continua. Sin embargo, se requieren grandes cantidades de medio, lo que presenta dificultades para adaptar este método a la producción a gran escala.

#### • **Etapas 2 – Purificación de las VLPs**

Para asegurar que las VLPs construidas y sintetizadas permanezcan intactas para las aplicaciones posteriores, la selección del esquema de purificación correcto es de vital importancia. Tanto la purificación como la caracterización se basan en la experiencia obtenida en experimentos con diferentes virus. Por lo tanto, las condiciones iniciales para el desarrollo de un protocolo de purificación para una VLP recién construida y no caracterizada pueden basarse en aquellas usadas con el virus nativo correspondiente (23).

Dentro de la purificación de las VLPs, se incluyen varias etapas, desarrolladas a continuación: 1) lisis de la célula para transferir las VLPs sintetizadas a la solución; 2) el proceso de clarificación para asegurar la eliminación de residuos celulares y otros agregados grandes; y 3) concentración para eliminar restos del huésped o impurezas del producto objetivo.

##### ➤ **2.1 – Lisis celular**

La lisis celular es un paso muy importante en la purificación de las VLPs. Sin embargo, debido a que muchos sistemas celulares de mamíferos e insectos aseguran la secreción de estas en los sobrenadantes del cultivo, la etapa de lisis celular no siempre es necesaria. Por ejemplo, hay casos en los que las VLPs del virus de la gripe producidas en cultivos celulares de insecto no requieren lisis celular.

El tratamiento simple de células eucariotas con soluciones que contienen detergentes es suficiente. Por el contrario, las células bacterianas, de levadura y vegetales requieren un tratamiento mecánico fuerte, con molinos o prensas, ultrasonidos, trituración con abrasivos (óxido de aluminio), ciclos repetidos de congelación y descongelación, y tratamientos enzimáticos.

Para la purificación de VLPs no caracterizadas con propiedades de estabilidad desconocidas, se prueban diferentes protocolos de lisis celular y composiciones de tampón de extracción para identificar el método óptimo que preserva la integridad de las partículas.

La lisis celular libera las proteínas de los sistemas de expresión, el ADN y todos los demás restos celulares. Para proteger las VLPs de la oxidación y las proteasas del huésped, los tampones de extracción se suelen complementar con agentes reductores y quelantes e inhibidores de la proteasa. Además, a veces se agregan nucleasas para reducir la cantidad de ácidos nucleicos del huésped en los extractos (23,28,29).

#### Aplicaciones de la endonucleasa

Se emplea en el proceso de purificación de VLPs para degradar los ácidos nucleicos residuales, y así cumplir con los requisitos de pureza. La Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) permiten 10 ng de ADN/dosis para vacunas parenterales y 100 µg de ADN/dosis para vacunas orales.

Para una digestión adecuada del ADN, se requieren entre 10–50 U/ml de endonucleasa, aunque la concentración óptima variará con la concentración de ADN y ARN, la temperatura de incubación, el pH, el tiempo y la concentración de magnesio (28).

#### ➤ 2.2 – Clarificación o limpieza del lisado celular

La clarificación se realiza mediante centrifugación a baja velocidad, filtración en profundidad o filtración de flujo tangencial (FFT). En general, se prefiere la FFT debido a su robustez y escalabilidad. Para ello, se utiliza un filtro para separar o aislar partículas de un tamaño determinado. A diferencia de la filtración tradicional, la solución se hace circular por el filtro en lugar de forzarlo a pasar a través de él, y se establece una diferencia de presiones.

#### ➤ 2.3. – Concentración de la muestra con VLPs

Tras la clarificación, las soluciones que contienen VLPs deben concentrarse y purificarse más. Varios virus y VLPs son lo suficientemente estables para soportar la precipitación con sulfato de amonio y/o polietilenglicol (PEG). Con la precipitación se consigue disminuir significativamente la cantidad de impurezas derivadas del huésped, lo que reduce el número de etapas posteriores de purificación por centrifugación y cromatografía.

A escala de laboratorio, la purificación adicional de VLPs por ultracentrifugación en gradientes de CsCl o sacarosa suele ser suficiente para obtener preparaciones adecuadas para aplicaciones posteriores.

La ultracentrifugación de sacarosa funciona mediante la colocación en capas de concentraciones diferentes y discontinuas de sacarosa. Cada concentración se recoge para su análisis después de la centrifugación. Dada la densidad diferencial de cada capa, las VLPs migrarán hasta alcanzar una zona de densidad similar, separándolas de otros contaminantes que no se pudieron eliminar previamente. Las VLPs forman una banda visible entre aproximadamente 30 - 40% de sacarosa o en la interfaz (en un gradiente de 20% y 60%), recolectándose del gradiente y almacenándose.

Las VLPs se pueden purificar mediante ultracentrifugación en un gradiente de CsCl. Sin embargo, debe evitarse el uso de este para la etapa de purificación, ya que el CsCl purificado puede ser de tamaño heterogéneo debido a partículas rotas, y puede traer impurezas en el proceso posterior (28).

En los procesos a escala industrial, el uso de la ultracentrifugación tiene algunas restricciones debido al riesgo de agregación de las VLPs, la falta de escalabilidad y el aumento del coste. Por lo tanto, se suelen utilizar procesos cromatográficos especiales.

Dependiendo de las propiedades de la VLP, se utilizan diferentes columnas de exclusión de tamaño, intercambio iónico y afinidad.

Cuando se utilizan determinados sistemas microbianos, como es el caso de *E. coli*, es necesario eliminar el lipopolisacárido (LPS) y las endotoxinas. Para ello se utiliza la cromatografía de intercambio iónico o la membrana de adsorción. Las VLPs son de naturaleza hidrofóbica, al igual que el LPS, suponiendo esto un problema en la separación. En cambio, las endotoxinas interactúan correctamente con las partículas de la membrana, y posteriormente pueden liberarse por tratamiento con solventes, detergentes suaves o una combinación de ambos. Para evitar este problema, se prefieren los sistemas de expresión basados en levadura o células de insecto (23,28).

- **Etapa 3 – Caracterización de las VLPs**

A continuación, la caracterización de las VLPs incluye la determinación de la composición de aminoácidos, el peso molecular y la pureza. Se puede examinar mediante diferentes métodos según sus propiedades bioquímicas, biofísicas y biológicas: espectrometría de masas (MS) que permite la medición de la masa molecular de las proteínas ensambladas; cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC); electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS/PAGE); microscopía electrónica (de transmisión TEM o criogénica Cryo-EM); ELISA; Western blot; entre otros (10).

Un análisis de microscopía electrónica es necesario como una prueba visual final de las nuevas VLPs sintetizadas porque las pruebas indirectas mencionadas anteriormente pueden identificar grandes agregados de proteínas no estructuradas como VLPs (23).

- **Etapa 4 – Formulación de las vacunas VLP**

La formulación de una vacuna se refiere a los componentes que forman la solución administrable final, incluidos los adyuvantes y los excipientes. Implica la investigación de los diversos componentes de una vacuna en diferentes condiciones ambientales, con la intención de formular un producto adecuado para la administración, eficaz, seguro y que se mantengan estable durante el transporte y el almacenamiento. Las vacunas basadas en VLP generalmente se formulan en excipientes de sacarosa y Tween®. Algunas formulaciones finales pueden contener aminoácidos, sulfato hidroxifosfato de aluminio amorfo, carbohidratos, L-histidina, polisorbato 80, borato de sodio, etc. El producto final se filtra de forma estéril utilizando un filtro de 0,22 µm (28).

Muchas VLPs poseen características que pueden conferir algunas propiedades autoinmunoestimuladoras. Esto facilita la inducción de respuestas inmunitarias por VLPs sin la necesidad de adyuvantes; sin embargo, su uso puede mejorar la inmunogenicidad de la vacuna y promover la activación de un tipo específico de respuesta inmune. Muchas vacunas VLP aprobadas hasta el momento están formuladas con sales de aluminio, el adyuvante más utilizado en humanos, para mejorar la inmunogenicidad de los antígenos (10,31).

### **III. Adyuvantes utilizados en vacunas VLP**

Los adyuvantes son sustancias de estructura química muy variada utilizados para reforzar la respuesta inmune contra un antígeno administrado simultáneamente. Su incorporación a las vacunas VLP permite: incrementar la respuesta inmune en población con capacidad reducida de inmunorrespuesta (lactantes, ancianos y personas inmunodeprimidas), utilizar menores cantidades de antígeno en una vacuna, alcanzando mayor cobertura de personas vacunadas, y reducir las dosis de vacunas, mejorando su aceptación por las personas, así como el coste-beneficio (32,33).

Hasta la fecha, la mayoría de las vacunas VLP con licencia utilizan las sales de aluminio. Pero ciertos patógenos pueden requerir una optimización adicional, utilizándose por ello nuevas clases de adyuvantes como liposomas, agonistas de receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs), partículas poliméricas, emulsiones, citoquinas y toxinas bacterianas (34). Algunos de los adyuvantes más ampliamente utilizados en las vacunas VLP se describen a continuación.

### **Compuestos de aluminio**

Los adyuvantes a base de sales de aluminio representan uno de los primeros adyuvantes desarrollados para la formulación de vacunas. Los compuestos empleados son el hidróxido ( $\text{Al}(\text{OH})_3$ ), el fosfato ( $\text{Al}_4(\text{OHPO}_4)_3$ ) y el sulfato hidroxifosfato ( $\text{Al}(\text{OHPO}_4)\text{SO}_4$ ) de aluminio.

El mecanismo de acción del aluminio todavía no se comprende completamente, aunque se ha descrito que depende fundamentalmente del efecto de depósito y de un efecto citolítico en el sitio de inoculación (35). Además, múltiples informes demuestran que el aluminio funciona como un sistema de administración al unirse al antígeno y formar agregados particulados que estimulan la captación de antígeno por las células dendríticas en el lugar de la inyección. Cabe destacar que las sales de aluminio promueven principalmente una respuesta inmune Th2, pero también ejercen un efecto limitado en la estimulación de la inmunidad de tipo Th1 y las respuestas de linfocitos T citotóxicos (34).

### **Adyuvantes agonistas de los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs)**

Los PRRs son receptores que reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) mostrados por los agentes patógenos. Son responsables de la estimulación del sistema inmune innato que se requiere para el inicio de la respuesta inmune adaptativa. Los PAMPs tienen diversas composiciones y estructuras bioquímicas como son: ácidos nucleicos, incluyendo ADN bacteriano y viral, y ARN viral, la pared celular bacteriana y los componentes de la superficie, incluidos los lipopolisacáridos (LPS), peptidoglicanos, lipoproteínas, y carbohidratos de glucano, presentes en diversas estructuras de patógenos como hongos, bacterias y virus. Es por esto, que muchos adyuvantes agonistas de PRRs son compuestos derivados de PAMPs o entidades moleculares que imitan su estructura (34).

- **Análogos del lípido A: MPL**

El 3-O-desacil-4'-monofosforil lípido A es un potente agonista del receptor TLR4, capaz de inducir una respuesta inmune mediada por Th1 y producción de anticuerpos. Es una endotoxina lipídica bacteriana extraída de los lipopolisacáridos de *Salmonella minnesota* R595. Mantiene las propiedades inmunoestimulantes del LPS sin su toxicidad característica, y fue el primer adyuvante agonista de TLR en obtener una licencia para una vacuna humana (34). Actualmente se estudia en numerosos ensayos clínicos en humanos y se emplea en diversas vacunas formando parte de los sistemas adyuvantes AS01, AS02 y AS04, pertenecientes a GSK, con el fin de mejorar las vacunas existentes y ampliar las posibilidades de uso contra nuevas enfermedades, tanto con fines profilácticos como terapéuticos (35).

- **AS04**

Está compuesto por MPL mezclado con una sal de aluminio (fosfato o hidróxido). Ha demostrado la capacidad de estimular eficazmente el TLR4, induciendo una respuesta inmune mediada por Th1. Actualmente, dos vacunas VLP que están en el mercado se formulan con este adyuvante, Cervarix<sup>®</sup> y Fendrix<sup>®</sup> (Tabla 1). Cervarix<sup>®</sup>, formulada con AS04, demostró producir más cantidad de anticuerpos neutralizantes contra el VPH que una formulación análoga que solo contiene sal de aluminio.

En sujetos sanos, la vacunación contra el VHB con las vacunas VLP adyuvadas con sales de aluminio ha demostrado una eficacia muy alta. Sin embargo, entre el 30 - 40% de los pacientes hemodializados no se someten a la seroconversión ni desarrollan inmunidad anti-HBsAg protectora después del calendario de vacunación. Por esta razón, GSK ha desarrollado una vacuna VLP contra el VHB (Fendrix<sup>®</sup>) formulada con la misma composición antigénica que la vacuna actual (HBsAg) pero con AS04 en lugar de con sales de aluminio. Ha demostrado la capacidad de provocar una respuesta de anticuerpos más temprana y superior en pacientes hemodializados en comparación con la vacuna estándar contra el VHB (34).

- AS01 / AS02

Fueron desarrollados por GSK y además de tener MPL, también poseen QS21, una molécula de saponina natural extraída de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina. AS01 está formulado con liposomas, mientras que el AS02 es una emulsión. El QS21 promueve la generación de anticuerpos y la activación de las células T CD8<sup>+</sup>, y los liposomas / emulsiones estimulan la captación de antígeno.

- CpG: oligodesoxinucleótidos de citosina fosfoguanosina

Los ODNs CpG son oligodesoxinucleótidos sintéticos (ODN) de 18–25 bases compuestos de motivos CpG no metilados reconocidos por los receptores TLR9. Son moléculas de ADN sintético que desencadenan la activación de las células B e inducen una respuesta inmune de T CD4<sup>+</sup> tipo Th1 sobre Th2 (19,36).

Adyuvantes de emulsión

Los adyuvantes de emulsión se formulan con aceites como escualeno (por ejemplo, MF59), saponina (por ejemplo, ISCOMATRIX) o con aceites minerales (por ejemplo, montanida). Al igual que las sales de aluminio, son partículas capaces de estimular la captación de antígenos por la CPA (34).

- MF59

Es una nano-emulsión de aceite en agua que contiene un 4,3% del aceite biodegradable de escualeno, estabilizado por dos surfactantes no iónicos: Tween 80 y el Span 85, con una fase continua de tampón citrato de baja fuerza iónica. Este adyuvante interactúa con las CPA en el sitio de inoculación, aumentando la eficiencia de la presentación antigénica y estimulando una respuesta inmune significativa mediada por anticuerpos. Varios ensayos clínicos realizados han demostrado su escasa toxicidad en humanos. Se utiliza en vacunas contra el virus de la gripe (H5N1 y H5N3), logrando una mayor protección en personas de edad avanzada (35).

- ISCOMATRIX

Este adyuvante está formado por la combinación de saponina, el glucósido extraído de *Quillaja saponaria* Molina (QS21), colesterol y fosfolípidos. Tiene propiedades de presentación y administración de antígenos a las CPA, lo que resulta en la estimulación de las respuestas mediadas por Th1 y Th2 y la producción de anticuerpos (34).

#### IV. Futuro de las vacunas VLP

Las VLPs representan un nuevo enfoque para el desarrollo de vacunas contra virus, aunque solo unas pocas han llegado al mercado y actualmente no se dispone de vacunas VLP contra virus emergentes. Esto es debido no solo a la falta de conocimiento de esos nuevos virus, sino también a las limitaciones de la tecnología de purificación de las VLPs (37).

Vacunas VLP frente a la malaria

Hasta la fecha no existe una vacuna disponible comercialmente contra la malaria en Europa o en Estados Unidos. Sin embargo, Mosquirix™ (RTS, S/AS01) se considera la primera candidata como vacuna VLP frente a la malaria dirigida a la etapa preeritrocítica. Es una vacuna inyectable que proporciona una protección parcial contra el paludismo en niños pequeños y que está siendo evaluada en África subsahariana.

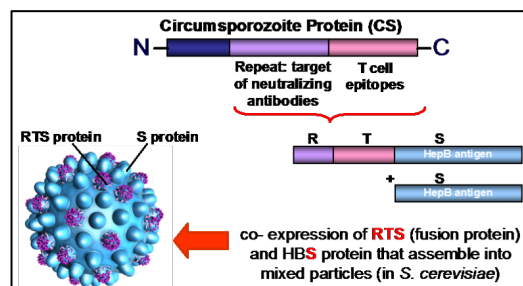


Figura 4: RTS,S VLP (tomada de (38))



Hasta ahora todas las vacunas VLP que hemos visto se dirigen contra virus, en cambio esta es la primera vacuna que está en investigación contra una enfermedad parasitaria producida por *Plasmodium falciparum* (6). Mosquirix™ está compuesta por el antígeno de superficie del VHB (HBsAg) y partes de la proteína circumsporozoito (CSP) del parásito de la malaria (Figura 4). Estos son la repetición central en tándem (R) y los epítomos del carboxi terminal de CSP (T). Las tres partes (RTS) están diseñadas en el HBsAg, y se expresan en *S. cerevisiae* (5,7,38). Además, está formulada con el adyuvante AS01, descrito anteriormente. Esta vacuna ha demostrado una mejor respuesta inmune y una mayor eficacia en varios ensayos clínicos cuando se formula con AS01 frente a AS02 (34).

El estudio principal de Mosquirix™ mostró que puede prevenir la malaria en niños de 6 semanas a 17 meses en el momento de la primera dosis. La protección que ofrece se reduce con el tiempo después de tres dosis y, por lo que se recomienda una cuarta inyección 18 meses después de las tres primeras. En julio de 2015, el Comité de Medicamentos para Uso Humano (CHMP) de la EMA, concluyó que los beneficios de la vacuna superan sus riesgos y emitió una opinión científica positiva (38). Posteriormente, en el 2016, la OMS anunció que la vacuna RTS, S se empezaría a utilizar en proyectos piloto en tres países de África subsahariana: Ghana, Kenia y Malawi. El estudio observacional (NCT03806465) (39) comenzó el 25 de febrero de 2019, y se llevará a cabo hasta diciembre de 2022. Estos proyectos piloto podrían abrir el camino a una utilización más amplia de la vacuna, siempre que su seguridad y eficacia se consideren aceptables. Los ensayos clínicos de fase III han demostrado la seguridad y la eficacia moderada de la vacuna en 15.000 bebés africanos. Sin embargo, la eficacia de la vacuna ha mostrado una gran variabilidad, debido a varios factores y dificultades en el desarrollo de la misma, incluida la intensidad de la transmisión de la malaria, la edad de los pacientes en el momento de la vacunación y el tipo de adyuvante utilizado.

Otra vacuna (VLP R21) contra la malaria se encuentra en la fase I /IIa de ensayos clínicos. En contraste con Mosquirix™, que muestra CSP en solo el 20% de las subunidades de HBsAg, consiste en un antígeno de CSP fusionado directamente con HBsAg y, por lo tanto, tiene una proporción de antígeno más alta. Ha mostrado una alta inmunogenicidad en modelos murinos con dosis bajas. Además, la adición de adyuvantes potentes (Matrix-M y Abisto-100) ha proporcionado protección en ratones, así como altos niveles de células B y T después de la exposición con esporozoitos transgénicos (7).

### **Vacunas VLP frente al virus de la gripe**

Tal y como se comentó anteriormente, Flublok® es la única vacuna VLP aprobada frente al virus de la gripe. Debido a la alta mutación de estos virus, es difícil predecir con exactitud las cepas en circulación en la próxima temporada de invierno. Un enfoque prometedor será el desarrollo de vacunas VLP que contengan múltiples proteínas HA y NA (40).

Se demostró que las vacunas VLP de la gripe estacional trivalente derivadas del cultivo de células de insecto son más inmunogénicas en comparación con las producidas a base de huevo (ensayo clínico en fase II de la vacuna VLP de gripe de temporada, Novavax, Inc.). Esta última empresa ha desarrollado una vacuna VLP contra el H5N1 producida en células de insectos que se encuentra en ensayo clínico de fase I (37,39). Además, se están investigando nuevos enfoques de formulación para mejorar la estabilidad de estas vacunas. Se han explorado nuevas formulaciones que emplean rutas de administración alternativas en varios modelos animales. Las formulaciones administradas por vía intradérmica fueron más efectivas que la administración intramuscular, lo que indica un efecto significativo de la vía de administración sobre la eficacia de la vacuna VLP contra la gripe (12).

### **Vacunas VLP frente al virus de la hepatitis C (VHC)**

El virus de la hepatitis C es un virus envuelto de ARN. La infección aguda por el VHC generalmente produce infección crónica que puede conducir a cirrosis o carcinoma hepatocelular.

Actualmente no existe una vacuna aprobada para el VHC, pero recientemente, se han puesto a disposición tratamientos antivirales altamente eficaces. La búsqueda de vacunas se complica por el número significativo de genotipos del VHC que surgen de las altas tasas de error de la ARN polimerasa viral de baja fidelidad (12). El genoma del VHC codifica un polipéptido de aproximadamente 3000 aminoácidos que, a través de la proteólisis postraduccional se escinde en 10 proteínas diferentes, incluida la proteína de la nucleocápsida y dos glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2). Varios estudios han utilizado la proteína E1, ensamblada como una VLP, como base para una vacuna contra el VHC. Las proteínas E1 y E2 pueden autoensamblarse en VLP inmunogénicas, mientras que la inclusión de antígenos del VHC en VLP heterogéneas (quiméricas) también es un enfoque prometedor. Estas VLP se producen utilizando diferentes sistemas de expresión tales como bacterias, levaduras, células de mamíferos, plantas o insectos.

Las VLPs derivadas del VHB se han evaluado como portadoras capaces de presentar epítomos heterólogos, incluidos los antígenos derivados del VHC. Las VLPs quiméricas se han generado al fusionar los antígenos diana con las proteínas de la cápsida viral, capaces de autoensamblarse en las VLPs. Los epítomos específicos del VHC derivados de la región hipervariable de la proteína E2 se insertaron en las VLPs de HBsAg recombinantes que se secretaron a partir de células de mamíferos inoculadas. Estas partículas fueron reconocidas por un suero humano anti-VHC positivo que contiene anticuerpos frente al epítomo E2 del VHC que se incluyó en las VLPs, lo que sugiere que la estructura antigénica expresada en la superficie de las partículas se parecía mucho a la estructura auténtica (41).

### **Vacunas VLP frente al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)**

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es un virus envuelto de ARN de la familia *Retroviridae*, responsable de causar el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La terapia antirretroviral y diversos métodos de prevención han reducido con éxito la incidencia del SIDA. Sin embargo, la erradicación completa requiere un gran avance, como el descubrimiento de una vacuna segura y altamente eficaz. Hasta la fecha, se han realizado más de 300 ensayos clínicos para evaluar diversas vacunas candidatas contra el VIH, pero ninguno ha demostrado lo que se deseaba. Uno de los principales desafíos en el desarrollo de una vacuna contra el VIH incluye la alta variabilidad del genoma viral, lo que permite al virus evadir el sistema inmunitario del huésped; además de la presencia de epítomos conservados poco inmunogénicos que no logran provocar anticuerpos ampliamente neutralizantes y la falta de un modelo animal adecuado.

Las vacunas VLP representan una estrategia prometedora y segura para el desarrollo de una vacuna eficaz contra el VIH, debido a que proporcionan ambos tipos de respuesta inmunitaria, y tienen la posibilidad de expresar múltiples epítomos.

El genoma del VIH contiene 3 genes principales: gag, pol y env. Gag codifica los tres dominios de la cápsida del virión. Las proteínas de la envoltura están codificadas por el gen env y son gp120 y gp41. Finalmente, pol codifica las proteínas enzimáticas implicadas en el ciclo viral (transcriptasa reversa (RT), proteasa e integrasa). Las vacunas VLP del VIH se han producido en *S. cerevisiae*, las cuales ya han alcanzado la fase de ensayos clínicos; pero también líneas celulares de mamíferos como HEK293, para la producción de vacunas VLP basadas en las proteínas gag y/o env. Los sistemas de células de insecto también se han utilizado para la producción de vacunas de gag-env y se han desarrollado líneas celulares de insectos estables que producen la poliproteína de Gag para la expresión de estas vacunas.

Las vacunas VLP basadas en Gag del VIH (Pr55gag) se han mostrado prometedoras como candidatas en modelos animales que incluyen primates no humanos. Además, se han explorado diversos enfoques: la expresión de gp120/160 en forma trimérica, la expresión de una proteína de fusión Gag-RT, la expresión de la molécula completa de gp120 y la coexpresión de genes estructurales del VIH con ADN o vectores víricos vivos como el virus vaccinia Ankara (MVA).

La obtención de material puro en cantidad suficiente para ensayos clínicos en humanos representa un reto tecnológico importante en el desarrollo de estas vacunas. Para resolver los problemas de estabilidad se han utilizado varias técnicas. Se ha visto que las VLPs almacenadas a -70 °C durante 12 meses en trehalosa al 15% mostraron una morfología intacta y produjeron protección a pesar de dos ciclos de congelación y descongelación (7,12).

### **Otros virus en investigación para generar vacunas VLP**

Además de los virus comentados, actualmente existe una gran multitud de ensayos preclínicos y clínicos que tratan de poner en el mercado vacunas VLP eficaces frente a otros virus que amenazan la salud (virus de Norwalk, virus del ébola, virus Marburg, etc.).

El **virus de Norwalk (VN)** es la causa principal de gastroenteritis viral en humanos de todas las edades, propagándose fácilmente de una persona a otra en espacios cerrados; y aunque generalmente no origina ninguna enfermedad grave en poblaciones sanas, puede ser fatal en niños y personas con un sistema inmunológico débil. Este virus es generalmente muy diverso, y no puede cultivarse en cultivos celulares, por lo que no hay ninguna vacuna disponible.

Se han evaluado diferentes vías de administración, sistemas de expresión y formulaciones. Por ejemplo, las VLPs derivadas de células de insecto se administraron por vía oral sin adyuvante a ratones para evaluar su potencial, viendo que la administración de una dosis oral de 50 µg produjo gran cantidad de anticuerpos humorales y mucosos. También se ha realizado un estudio clínico de fase I para la evaluación de una vacuna VLP bivalente adyuvada con MPL e hidróxido de aluminio (NCT01168401).

## **CONCLUSIONES**

1. Las vacunas basadas en VLP presentan múltiples ventajas frente a las vacunas tradicionales: estimulan tanto de la inmunidad innata como adaptativa, no producen la enfermedad al ser partículas vacías de los virus nativos, y por ello, presentan mayor seguridad a la hora de su producción.
2. Las VLPs pueden ser de diferentes tipos, lo que permite mimetizar las diferentes características de cada uno de los virus nativos a los que se quiere hacer frente.
3. Existen múltiples sistemas de expresión, conociéndose las características de cada uno ellos, lo que permite seleccionar aquel que mejor se adapte a las cualidades que queramos darle a la vacuna en cuestión.
4. Las técnicas de purificación y caracterización cada vez son más amplias debido a la gran importancia que suponen estas etapas en la producción de las vacunas VLP, siendo por ello un campo de investigación muy amplio con el fin de obtener la mayor pureza con nuevos avances de la tecnología.
5. La adición de adyuvantes en este tipo de vacunas es necesaria para mejorar su inmunicidad. Actualmente, los más utilizados son las sales de aluminio, aunque están apareciendo otros como el MPL, AS01, AS02 y AS04, que ya se utilizan en algunas de las vacunas comercializadas.
6. Los virus emergentes son un campo de investigación interesante, ya que aún no hay vacunas VLP comercializadas que los puedan combatir.
7. Desde finales del siglo XX se han comercializado más de 20 vacunas VLP, y muchas otras se encuentran en desarrollo, por lo que se espera que en las próximas décadas el número de vacunas de este tipo aumente rápidamente.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Sanchez-Garcia L, Martín L, Mangues R, Ferrer-Miralles N, Vázquez E, Villaverde A. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microbial Cell Factories*. 2016;15(1):1-7.
2. Dingermann T. Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges. *Biotechnology Journal*. 2008;3(1):90-7.
3. Zdanowicz M, Chroboczek J. Virus-like particles as drug delivery vectors. *Acta Biochimica Polonica*. 2016.
4. Martín H., Molina M. Producción microbiana de proteínas recombinantes y metabolitos de uso farmacológico. Humberto Martín Brieva (coord.). *Fundamentos de Biotecnología Farmacéutica*. Madrid: Dextra Editorial S. L.; 2018. p. 240-249.
5. Kushnir N, Streatfield SJ, Yusibov V. Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development. *Vaccine*. 2012;31(1):58-83.
6. Mohsen MO, Zha L, Cabral-Miranda G, Bachmann MF. Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines. *Seminars in Immunology*. 2017;34(July):123-32.
7. Fuenmayor J, Gòdia F, Cervera L. Production of virus-like particles for vaccines. *New Biotechnology*. 2017;39:174-80.
8. Jennings GT, Bachmann MF. The coming of age of virus-like particle vaccines. *Biological Chemistry*. 2008;389(5):521-36.
9. Charlton Hume HK, Roldão A, Vidigal J, Lua LHL, Middelberg APJ, Carrondo MJT. Synthetic biology for bioengineering virus-like particle vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018;(June).
10. Lua LHL, Connors NK, Sainsbury F, Chuan YP, Wibowo N, Middelberg APJ. Bioengineering virus-like particles as vaccines. *Biotechnology and Bioengineering*. 2014;111(3):425-40.
11. Ding X, Liu D, Booth G, Gao W, Lu Y. Virus-Like Particle Engineering: From Rational Design to Versatile Applications. *Biotechnology Journal*. 2018;13(5):1-7.
12. Jain NK, Sahni N, Kumru OS, Joshi SB, Volkin DB, Russell Middaugh C. Formulation and stabilization of recombinant protein based virus-like particle vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2015;93:42-55.
13. Meireles LC, Marinho RT, Van Damme P. Three decades of hepatitis B control with vaccination. *World Journal of Hepatology*. 2015;7(18):2127-32.
14. Roldão A, Leda R, Jt M. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Reviews Ltd*. 2010;9(10):1149-76.
15. (VBI). VBI Vaccines Inc. [Internet]. 2019 [citado 10 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.vbivaccines.com>
16. Sanyal G, Shi L. A review of multiple approaches towards an improved hepatitis B vaccine. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. 2009;19(1):59-72.
17. SAGE (Strategic Advisory Group of Experts on Immunization). *Hepatitis E Vaccine : Composition , Safety , Immunogenicity and Efficacy*. 2014.
18. EMA. European Medicines Agency [Internet]. 2019 [citado 18 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en>
19. (FDA). Food and Drug Administration [Internet]. 2019 [citado 15 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.fda.gov>
20. (AEMPS). Centro de Información de Medicamentos - CIMA [Internet]. 2019 [citado 14 de abril de 2019]. Disponible en: <https://cima.aemps.es/cima/publico/home.html>
21. (GSK). GlaxoSmithKline [Internet]. 2019 [citado 18 de abril de 2019]. Disponible en: <https://www.gsk.com/en-gb/>

22. (Dynavax). DYNAVAX [Internet]. 2019 [citado 15 de abril de 2019]. Disponible en: <http://www.dynavax.com>
23. Zeltins A. Construction and characterization of virus-like particles: A review. *Molecular Biotechnology*. 2013;53(1):92-107.
24. Reddy V, Ho P, Johnson J, Carrillo-Tripp M, Montiel García D, Brooks III CL. VIPERdb - Virus Particle ExploreR [Internet]. 2019. Disponible en: <http://viperdb.scripps.edu>
25. Forouhar-Kalkhoran B. A Short Review on Virus-Like Particles as Vaccine and Delivery Systems. *Journal of molecular biology and genetics*. 2017;2(May):53-9.
26. Ferrer-Miralles N, Domingo-Espín J, Corchero J, Vázquez E, Villaverde A. Microbial factories for recombinant pharmaceuticals. *Microbial Cell Factories*. 2009;8:1-8.
27. Walsh G. 2015-Review-Biopharmaceutical benchmarks 2014. 2014;32(10).
28. Merck KGaA. Generic Process of Virus-Like Particle ( VLP ) Based Vaccine Manufacturing. 2016.
29. Stephen SL, Beales L, Peyret H, Roe A, Stonehouse NJ, Rowlands DJ. Virus-Derived Nanoparticles for Advanced Technologies: Methods and Protocols. Vol. 1776. 2018. 97-123 p.
30. Gurramkonda C, Rinas U, Khanna N, Lünsdorf H, Adnan A. Virus-like particle production with yeast: ultrastructural and immunocytochemical insights into *Pichia pastoris* producing high levels of the Hepatitis B surface antigen. *Microbial Cell Factories*. 2011;10(1):48.
31. Donaldson B, Lateef Z, Walker GF, Young SL, Ward VK. Virus-like particle vaccines: immunology and formulation for clinical translation. *Expert Review of Vaccines*. 2018;17(9):833-49.
32. Álvarez García FJ. Comité Asesor de Vacunas - Asociación Española de Pediatría (AEP). 2019.
33. Pasquale A, Preiss S, Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*. 2015;3(2):320-43.
34. Cimica V, Galarza JM. Adjuvant formulations for virus-like particle (VLP) based vaccines. *Clinical Immunology*. 2017;183:99-108.
35. Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 2014;32(2):106-14.
36. Apostólico J de S, Lunardelli VAS, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi , and Licensing . *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:1-16.
37. Liu J, Dai S, Wang M, Hu Z, Wang H, Deng F. Virus like particle-based vaccines against emerging infectious disease viruses. *Virologica Sinica*. 2016;31(4):279-87.
38. (EMA). Mosquirix™ - European Public Assessment Report (EPAR). 2015.
39. (NIH). ClinicalTrials.gov [Internet]. 2019 [citado 22 de abril de 2019]. Disponible en: <https://clinicaltrials.gov>
40. Quan F-S, Lee Y-T, Kim K-H, Kim M-C, Kang S-M. Progress in Developing Virus-like Particle Influenza Vaccines. *HHS Public Access*. 2016;263(2):219-27.
41. Masavuli MG, Wijesundara DK, Torresi J, Gowans EJ, Grubor-Bauk B. Preclinical development and production of virus-like particles as vaccine candidates for hepatitis C. *Frontiers in Microbiology*. 2017;8(DEC):1-11.