

Condiciones de adsorción de un candidato vacunal basado en vesículas de membrana externa derivada de *Salmonella Paratyphi A* en adyuvantes de aluminio

Mabel Hernández-Cedeño*, Caridad Zayas-Vignier, José Luis Pérez-Quiñoy, Kirenia Blain-Torres, Jessy Pedroso-Fernández, Jean Pierre Soubal-Mora, Sonsire Fernández-Castillo, Reinaldo Acevedo-Grogues

Instituto Finlay de Vacunas. La Lisa, La Habana, Cuba

email: mahernandez@finlay.edu.cu

La capacidad inmunoestimuladora de la mayoría de las vacunas es potenciada mediante la adsorción en adyuvantes que contienen aluminio. Variando las condiciones de adsorción (pH, tiempo de adsorción) cambia la cantidad de antígeno adsorbida y por lo tanto la capacidad de estimulación del sistema inmune. El Instituto Finlay de Vacunas investiga un nuevo candidato vacunal basado en vesículas de membrana externa de *Salmonella Paratyphi A* (VME-SPA). El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de adsorción de las VME-SPA en dos adyuvantes de sales de aluminio ($\text{Al}(\text{OH})_3$ y AlPO_4). Para ello, las VME-SPA fueron adsorbidas en ambos adyuvantes bajo diferentes condiciones de pH y tiempo. Mediante la construcción de una Isoterma de Langmuir se determinaron parámetros como la capacidad adsortiva (q_m) y el coeficiente de adsorción (K_d). El lote de VME-SPA empleado estaba formado por poblaciones de nanoestructuras con un tamaño de partículas entre 60 y 100 nm. La adsorción de las VME-SPA en ambos adyuvantes, mostró valores $\geq 95\%$ a pH neutro (6,5-7,0). Las VME-SPA en presencia de AlPO_4 alcanzaron el estado de equilibrio en menor tiempo (99% a partir de 30 min) en comparación con $\text{Al}(\text{OH})_3$ (95% a partir de 3 h). Las isotermas evaluadas para ambos adyuvantes cumplieron con el modelo de Langmuir ($R^2 \geq 0,99$), con valores de q_m y K_d diferentes entre los sistemas de adsorción. El estudio demostró que las VME-SPA se adsorbieron satisfactoriamente en ambos geles, proceso en el que están involucrados diferentes mecanismos de adsorción.

Palabras clave: *Salmonella Paratyphi A*; adsorción; adyuvantes; hidróxido de aluminio; fosfato de aluminio.

Introducción

Las sales de aluminio, tales como el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio, se aplican rutinariamente para mejorar la inmunogenicidad de antígenos en las formulaciones vacunales. La adsorción de los antígenos en estos adyuvantes, depende de las características físicas y químicas del antígeno, del tipo de adyuvante y de las condiciones de adsorción.⁽¹⁾ Este proceso tiene como principal mecanismo las interacciones electrostáticas, aunque los efectos hidrofóbicos, los puentes de hidrógenos y las interacciones de van der Waals también juegan un papel importante.⁽²⁾

A pesar de que el aluminio es ampliamente usado, la vía por el cual potencia la respuesta inmune no es completamente conocida. Estudios realizados han propuesto algunos mecanismos entre los que se incluye un efecto de depósito, asegurando una lenta y prolongada liberación del antígeno en el sitio de inoculación, para estimular el reclutamiento de células presentadoras de

antígenos en estos sitios.⁽³⁾ Las sales de aluminio también tienen efecto inmunopolarizador, direccionando la respuesta preferentemente hacia un patrón de tipo Th2. Estos fenómenos se han relacionado con la activación del inflammasoma,⁽⁴⁾ pero en gran medida dependen de la adsorción del antígeno en el gel de aluminio, por lo que ha sido generalmente aceptado que los antígenos deben adsorberse en porcentajes elevados para lograr la mejor eficiencia de la vacuna.

A pesar del largo historial de éxito en la mejora de la inmunogenicidad de las vacunas, el proceso de formulación con estos adyuvantes se basa en gran medida en ensayo y error. La importancia de la adsorción y las fuerzas de adsorción, recientemente se han convertido en temas a considerar en la elaboración de las nuevas formulaciones vacunales.⁽³⁾

La enfermedad causada por las especies de *Salmonella* en la actualidad constituye un tema importante para la salud a nivel mundial. La fiebre tifoidea es causada

* Licenciada en Biología. Grupo de Evaluación de Biológicos. Laboratorio de Inmunología preclínica.

por la subespecie *Salmonella enterica* sevarar Typhi (*S. Typhi*), mientras que la fiebre paratifoidea tiene como principal agente etiológico a *Salmonella enterica* sevarar Paratyphi A, B y C (*S. Paratyphi A/B/C*). En conjunto conocida como fiebre entérica, la fiebre tifoidea y paratifoidea prevalecen mayormente en países subdesarrollados,⁽⁵⁾ siendo más representativa en regiones como África y Asia.⁽⁶⁾

En la última década los casos producidos por *S. Paratyphi A* se han incrementado hasta aproximadamente 5,4 millones de casos anuales.⁽⁷⁾ Con el aumento de los casos provocados por *S. Paratyphi A* y la resistencia a antibióticos de los serovares de *Salmonella enterica* responsables de la enfermedad invasiva, se hace cada vez más importante el control y prevención de la enfermedad a través de las vacunas, como una solución efectiva de este problema de salud mundial.⁽⁸⁾ Hasta la actualidad no existen vacunas licenciadas contra *S. Paratyphi A*.⁽⁹⁾

Las vacunas contra *S. Paratyphi A* que se encuentran actualmente en desarrollo, están basadas principalmente en células enteras vivas atenuadas y en el antígeno-O del lipopolisacárido conjugado a proteínas.⁽¹⁰⁾

El Instituto Finlay de Vacunas tras 25 años de haber desarrollado la vacuna anti-meningocócica VAMENGOC-BC[®] posee una plataforma de investigación basada en el desarrollo de vacunas proteicas a partir de la obtención de vesículas derivadas de la membrana de los microorganismos.

El objetivo de este trabajo fue determinar las condiciones de adsorción de las vesículas de membrana externa de *S. Paratyphi A* (VME-SPA), en dos adyuvantes: hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

Materiales y Métodos

Materiales y reactivos

Todos los reactivos que se utilizaron en los ensayos físico-químicos son comerciales y de calidad puro para análisis, de los proveedores Sigma (EUA) y Merck (RFA).

Las VME-SPA (Lote experimental 16.04) se obtuvieron mediante el método de extracción con detergentes descrito por Pérez JL y colaboradores,⁽¹¹⁾ en la Dirección de Investigaciones del Instituto Finlay de Vacunas. Se emplearon adyuvantes basados en aluminio para el estudio de formulación: $AlPO_4$ (sintetizado en el

Instituto Finlay de Vacunas) y $Al(OH)_3$ (Alhydrogel[®]) del proveedor Brenntag Biosector (RFA).

Tamaño de partícula e índice de polidispersión

Para determinar el tamaño de partícula y el índice de polidispersión de las VME-SPA, se empleó un analizador de partículas Zetasiszer (Malvern Panalytical). La determinación se realizó con una fuente de laser fija y un ángulo de luz desviada de 173°. Las muestras se trabajaron a una concentración de proteínas entre 1-0,5 mg/mL. Se analizaron 10 réplicas de la muestra y se determinó la media aritmética de la talla con su correspondiente desviación estándar.

Barrido de pH

Se definió el pH al cual precipitaban las VME-SPA, en ausencia de adyuvante. Para ello se evaluó un rango de pH de 4,5 a 8,0 eliminando de los experimentos aquel pH en el cual se observara turbidez en la muestra.

Para determinar el pH de máxima adsorción se fijaron los valores de concentración para las VME-SPA (0,2 mg/mL) y los adyuvantes basados en aluminio (1mg/mL de Al^{3+}), este sistema se evaluó en un rango de pH de 5,0 a 7,5. Las muestras se dejaron en agitación con balas magnéticas a 150 rpm (agitador magnético, IKAMAN[®] REO) durante 1 h a temperatura y presión constantes (25°C, 1 atm). Posteriormente las muestras se centrifugaron a 800 g x 5 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado para la posterior evaluación del porcentaje de adsorción. Se realizaron tres réplicas del experimento.

Cinética de adsorción

Se evaluó la cinética de adsorción en los geles de aluminio con valores fijos de concentración para las VME-SPA (0,2 mg/mL) y de Al^{3+} (1mg/mL). Se trabajó en un rango de pH de 6,5 a 7,0.

Las VME-SPA se mezclaron con cada uno de los geles y se mantuvieron en agitación con balas magnéticas a 150 rpm (agitador magnético, IKAMAN[®] REO) durante 7 h a temperatura y presión constantes (25°C, 1 atm). Se tomaron muestras cada 1 h, que posteriormente fueron centrifugadas a 800 g x 5 min a 4°C. El sobrenadante fue colectado para la posterior evaluación del porcentaje de adsorción. Se realizaron tres réplicas del experimento.

Isoterma de Langmuir

Para la construcción de las isotermas se realizaron pruebas de adsorción variando las concentraciones iniciales de las VME-SPA, desde 0,1 mg/mL hasta 1 mg/mL

manteniendo constantes el volumen de adsorbato y la cantidad de adsorbente (1mg/mL de Al^{3+}).

El ensayo se realizó en un rango de pH de 6,5 a 7,0 en agitación continua con balas magnéticas a 150 rpm (agitador magnético, IKAMAN® REO) durante 4 h. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteína incorporada al gel de aluminio. Partiendo de estos datos, con la finalidad de estudiar la naturaleza de la adsorción, se realizaron ajustes a los parámetros del modelo Langmuir.

La capacidad adsortiva (q_m) y coeficiente de adsorción (Kd), se estimaron a partir de la regresión lineal de la isoterma.⁽¹²⁾ Cuando el R^2 de la regresión lineal alcanzó valores $\geq 0,99$, se asumió que la isoterma de adsorción cumplía con el modelo de Langmuir. Se realizaron tres réplicas del experimento.

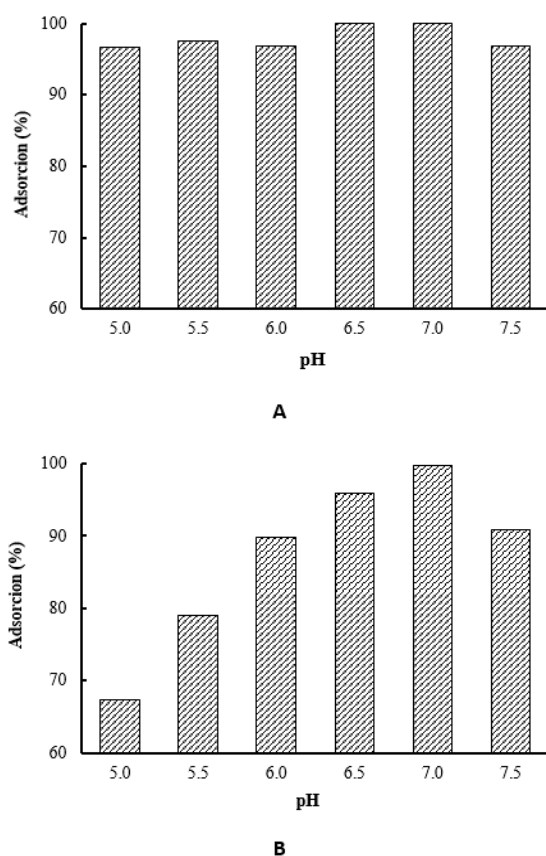


Fig. 1. Grado de adsorción de las vesículas de membrana externa de *S. Paratyphi A* (VME-SPA) en adyuvantes que contiene aluminio, bajo diferentes pH. Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo, el gráfico muestra la media de los valores obtenidos. **A.** VME-SPA adsorbidas en $AlPO_4$, **B.** VME-SPA adsorbidas en $Al(OH)_3$.

Tratamiento de las muestras. Cálculo del porcentaje de adsorción

La cantidad de proteína libre en el sobrenadante se determinó mediante ensayo descrito por Lowry y colaboradores.⁽¹³⁾ El porcentaje de adsorción refleja el equilibrio entre las VME-SPA libres en solución y la adsorbida. La cantidad adsorbida se calculó restando la cantidad de VMA-SPA presente en el sobrenadante del total de antígeno usado, el porcentaje de adsorción se calculó como se muestra en la siguiente ecuación:

$$\% \text{ adsorción} = (C_{\text{ads}} \times 100) / C_T$$

C_{ads} : Concentración de proteína adsorbida

C_T : Concentración total de proteína

Resultados

El análisis por difracción láser del lote experimental 16.04 de VME-SPA obtenido en el departamento de Biomoléculas Bacterianas del Instituto Finlay de Vacunas, mostró que las vesículas que componen estos extractos poseen una talla media de $79 \pm 21,88$ nm, con un índice de polidispersión de 0,3.

La determinación del rango de pH de equilibrio de la formulación se realizó mezclando las VME-SPA y los adyuvantes ($AlPO_4$ o $Al(OH)_3$) en un rango de pH de 5,0 a 7,5 (Fig. 1). En los resultados mostrados en la Figura 1A se observó un elevado nivel de adsorción cuando las vesículas se formularon con $AlPO_4$, con valores promedios superiores al 90% en el rango de pH estudiado. La adsorción en $Al(OH)_3$ mostró porcentajes de adsorción por encima del 90% a partir de pH 6,0; alcanzando el máximo valor a pH 7,0 (99,29%) (Fig. 1B).

La Figura 2 muestra el estudio de cinética de las VME-SPA empleando ambos adyuvantes. Como se observa en la Figura 2 A, pasados los primeros 30 min las VME-SPA alcanzaron valores de adsorción cercanos al 100% en presencia de $AlPO_4$. Estos valores se mantuvieron estables ($\geq 95\%$) en las siguientes 7 h. Por otro lado las VME-SPA adyuvadas en $Al(OH)_3$ se adsorbieron en un 95% a partir de las 3 h (Fig. 2B).

El desarrollo de la adsorción de cada sistema fue estudiado mediante la construcción de una isoterma, la cual siguió la ecuación de Langmuir. Los datos de la adsorción fueron analizados utilizando la ecuación de linealización de Langmuir, que permitió calcular la capacidad adsortiva (q_m) y el coeficiente de adsorción (Kd); los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Los dos sistemas cumplieron con el modelo descrito por Langmuir ($R^2 \geq 0,99$). La capacidad adsortiva obtenida a

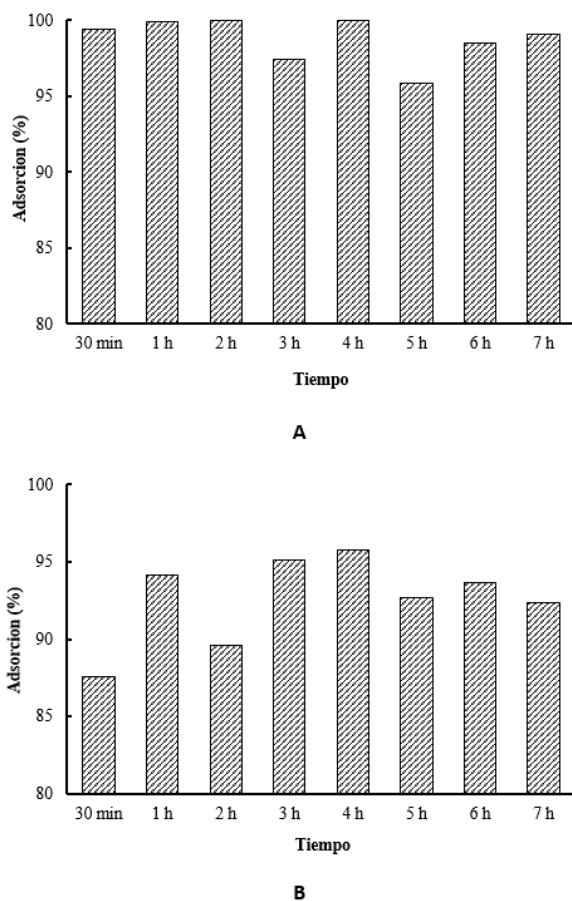


Fig. 2. Cinética de adsorción de las vesículas de membrana externa de *S. Paratyphi A* (VME-SPA) en adyuvantes que contienen aluminio. Se realizaron tres repeticiones de cada ensayo, el gráfico muestra la media de los valores obtenidos. **A.** VME-SPA adsorbidas en AlPO₄. **B.** VME-SPA adsorbidas en Al(OH)₃.

partir de la formulación de las VME-SPA en AlPO₄ fue mayor a la obtenida cuando es mezclada con Al(OH)₃ (Tabla 1). Se observó diferencias significativas entre los coeficientes de adsorción obtenidos ($K_d(\text{Al(OH)}_3) > K_d(\text{AlPO}_4)$), lo que pudiera estar asociado a la diferencia de carga de ambos geles a pH neutro.

Discusión

Tabla 1. Isotherma de Langmuir.

	Al ³⁺ (mg/mL)	q _m (mg/mg Al ³⁺)	Kd (mL/mg)	R ²
VME-SPA/AlPO ₄	1	0,312	10	0,990
VME-SPA/Al(OH) ₃	1	0,165	193	0,989

q_m: Capacidad Adsorptiva

Kd: Coeficiente de Adsorción

R²: Coeficiente de Determinación

Todos los reactivos que se utilizaron en los ensayos físico-químicos son comerciales y de calidad puro para análisis, de los proveedores Sigma (EUA) y Merck (RFA). Los adyuvantes basados en hidrogeles de aluminio continúan siendo una importante estrategia para el desarrollo y formulación de la mayoría de las vacunas en investigación y las aprobadas para uso en humanos. La adsorción de un antígeno en una vacuna que contiene aluminio es aceptada comúnmente como un importante factor para mejorar la respuesta inmune y el grado de adsorción del antígeno puede afectar esta respuesta.⁽¹⁴⁾ Actualmente se ha determinado que en vacunas diseñadas para humanos, el límite máximo aprobado de Al⁺ por dosis debe oscilar entre 0,85 y 1,25 mg.⁽¹⁵⁾

En este estudio se determinaron las condiciones óptimas de adsorción de las VME-SPA en dos adyuvantes que contienen aluminio (AlPO₄ y Al(OH)₃). Los resultados obtenidos mostraron porcentajes de adsorción superiores al 85% cuando la VME-SPA fueron formuladas tanto con Al(OH)₃ como con AlPO₄.

La adsorción puede tomar lugar generalmente por uno o dos mecanismos: las interacciones electrostáticas o intercambio de ligando. Mientras las interacciones electrostáticas requieren la presencia de cargas opuestas entre los antígenos y el adyuvante bajo una solución en particular, el intercambio de ligando requiere la presencia de fósforo en el antígeno de manera que pueda ser intercambiado por los grupos hidroxilos en los adyuvantes que contienen aluminio.⁽¹⁶⁾

Otros mecanismos de adsorción han sido propuestos como las interacciones hidrofóbicas e interacciones de superficie no asociadas con la carga y todos estos mecanismos pueden coexistir para un solo antígeno,⁽¹⁷⁾ especialmente para antígenos complejos como las VME que representan una combinación de proteínas y lípidos. Otro aspecto importante a tener en cuenta en el desarrollo de nuevas formulaciones adyuvadas en geles de aluminio, es el tamaño de partícula del antígeno de interés.

Estudios realizados por Huang y colaboradores,⁽¹⁵⁾ empleando diferentes modelos de proteínas, mostraron que la q_m en los sistemas que contenían $Al(OH)_3$ era inversamente proporcional al tamaño del antígeno, sin embargo en los sistemas que contenían $AlPO_4$ los valores de q_m eran independiente al tamaño. Si bien el lote de VME-SPA estudiado presenta tamaños de partículas entre 60 y 100 nm, es importante señalar que los geles de $Al(OH)_3$ y $AlPO_4$ están compuestos por partículas que oscilan entre 10 y 50 nm, que al agregarse forman poros irregulares con diámetros de 1 a 20 μm ,⁽¹⁸⁾ donde pueden quedar retenidas las VME-SPA.

Los sistemas de VME-SPA/ $AlPO_4$ y VME-SPA/ $Al(OH)_3$ se analizaron mediante la construcción de isoterma de Langmuir. Las propiedades adsorptivas pueden ser descritas mediante dos parámetros calculados a partir del modelo de Langmuir; la capacidad adsorptiva (q_m) que es la cantidad de antígeno adsorbido en una fase sólida (asumiendo que es una monocapa) y el coeficiente de adsorción (Kd) que describe la fuerza de adsorción del antígeno en la fase sólida.⁽¹²⁾ Como resultado se obtuvieron valores diferentes q_m y Kd, siendo VME-SPA / $AlPO_4$ el sistema con mayor q_m y menor Kd. El Kd es frecuentemente ignorado debido a los altos grados de variación (varios ordenes de magnitud) que han sido reportados para diferentes proteínas unidas al mismo adyuvante y con similar mecanismo de adsorción. Sin embargo, este parámetro puede emplearse como predictor del tipo de mecanismo de adsorción que interviene en el sistema.

Estudios previos sobre la adsorción de diferentes proteínas en adyuvantes que contiene aluminio (Tabla 2) han revelado, que los valores de Kd tienden a ser bajos en proteínas tales como la Lisozima, mioglobulina, seroalbúmina bovina; que son adsorbidas mediante fuerzas de atracción electrostáticas o hidrofóbicas.^(16,19) Proteínas como la α -Caseína desfosforilada y la ovalbúmina (OVA), que contienen de 0-2 grupos fosfatos presentan valores intermedios de Kd. Estas proteínas se pueden adsorber mediante intercambio de ligando, aunque se ha comprobado que también intervienen fuerzas electrostáticas.⁽¹⁹⁾ Se ha demostrado que las proteínas β -caseína (5 grupos fosfato),⁽¹⁴⁾ α -caseína (8 grupos fosfato),⁽²⁰⁾ y el antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B,⁽²¹⁾ presentan como mecanismo predominante de adsorción el intercambio de ligando, lo que coincide a su vez con los valores más altos de Kd.

Los resultados observados en la isoterma de Langmuir (Tabla 1), sugieren que la adsorción de las VME-SPA en $Al(OH)_3$ puede estar mediada por intercambio de ligando. Sin embargo, los valores de Kd en el sistema VME-SPA/ $AlPO_4$ (<12), sugieren que los mecanismos que median la adsorción en $AlPO_4$ pudieran ser

Tabla 2. Coeficiente de adsorción de diferentes proteínas en adyuvantes que contienen aluminio.

Proteína	Adyuvante	Kd (mL/mg)	Referencia
Mioglobina	$Al(OH)_3$	2	(21)
Lisozima	$AlPO_4$	6	(21)
BSA	$Al(OH)_3$	12	(21)
α -Caseína desfosforilada	$Al(OH)_3$	59	(20)
ovalbúmina	$Al(OH)_3$	86	(21)
β -Caseína	$AlPO_4$	115	(14)
α -Caseína	$Al(OH)_3$	2409	(20)
Antígeno de hepatitis B	$Al(OH)_3$	3660	(21)

electrostáticos o hidrofóbicos. Tanto el $Al(OH)_3$ como el $AlPO_4$ presentan grupos hidroxilos superficiales, por lo que pueden intercambiar ligados con antígenos fosforilados; sin embargo, el $Al(OH)_3$ es el que presenta mayor cantidad de sitios potenciales para la adsorción.⁽¹⁸⁾ Los antígenos más propensos a adsorberse mediante intercambio de ligando son aquellos que contienen grupos libres de fosfato o grupos fosfatos generados por la hidrólisis de fosfolípidos asociados a la membrana celular, como ocurre con el antígeno de superficie de hepatitis B.⁽²¹⁾

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el estudio de las condiciones de adsorción de las VME-SPA mostraron que en presencia de $AlPO_4$ y $Al(OH)_3$ se logran formulaciones con buenos porcentajes de adsorción. Las diferencias en los valores de coeficientes de adsorción sugirió que el proceso de adsorción de las VME-SPA en cada adyuvante está mediado por mecanismos diferentes. A pesar de estas diferencias se definieron las condiciones de adsorción de dos candidatos vacunales basados en VME-SPA. Solo los estudios de inmunogenicidad en animales permitirá discriminar cuál de estos candidatos resulte más eficiente en el desarrollo de una adecuada respuesta inmunológica contra *S. Paratyphi A*.

Referencias

- Gupta RK. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998;32:155-72.
- Al-shakhshir RH, Regnier FE, White JL, Hem SL. Contribution of Electrostatic and Hydrophobic Interactions to the Adsorption of Proteins by Aluminum-Containing Adjuvants. *Vaccine.* 1995;13(1):41-4.

3. Clapp T, Siebert P, Chen D, Jones Braun L, Braun LJ. Vaccines with Aluminium-Containing Adjuvants: Optimizing Vaccine Efficacy and Thermal Stability. *J Pharm Sci.* 2012;100(2):388-401.
4. Batista-Duharte A, Lastre M, Pérez O. Adyuvantes inmunológicos. Determinantes en el balance eficacia-toxicidad de las vacunas contemporáneas. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014;32(2):106-14.
5. Pakkanen SH, Kantele JM, Savolainen LE, Rombo L, Kantele A. Specific and cross-reactive immune response to oral *Salmonella* Typhi Ty21a and parenteral Vi capsular polysaccharide typhoid vaccines administered concomitantly. *Vaccine.* 2015;33(3):451-8.
6. Pakkanen SH, Kantele JM, Kantele A. Cross-reactive gut-directed immune response against *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A and B in typhoid fever and after oral Ty21a typhoid vaccination. *Vaccine.* 2012;30(42):6047-53.
7. Xiong K, Chen Z, Zhu C, Li J, Hu X, Rao X, et al. Safety and immunogenicity of an attenuated *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A vaccine candidate. *Int J Med Microbiol.* 2015;305(6):563-71.
8. Organización Mundial de la Salud. *Salmonella* (no tifoidea). Ginebra: OMS; 2017. p. 1-4. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/es/>.
9. Martin LB, Simon R, MacLennan CA, Tennant SM, Sahastrabudde S, Khan MI. Status of paratyphoid fever vaccine research and development. *Vaccine.* 2016;34(26):2900-2.
10. Dassarma P, Negi VD, Balakrishnan A, Kim J-M, Karan R, Chakravorty D, et al. Haloarchaeal gas vesicle nanoparticles displaying *Salmonella* antigens as a novel approach to vaccine development. *Procedia Vaccinol.* 2015;9:16-23.
11. Pérez JL, González Y, Año G, Cedré B, Valmaseda T, Alvarez M, et al. Obtención de extractos de membrana externa de *Vibrio cholerae* O1, mediante el uso de diferentes detergentes. *VacchiMonitor.* 2006;15(1):1-7.
12. Foo K, Hameed B. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem Eng J.* 2010;156(5):2-10.
13. Lowry OH, Rosebrough, Nira J, Farr L, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
14. Jully V, Moniotte N, Mathot F, Lemoine D, Preat V. Development of a High-Throughput Screening Platform to Study the Adsorption of Antigens onto Aluminum-Containing Adjuvants. *J Pharm Sci.* 2015;104(2):557-65.
15. Gołoś, Aleksandra, Lutyńska A. Aluminium-Adjuvanted Vaccines - A Review of the current state of knowledge. *Przegl Epidemiol.* 2015;69(2):731-4.
16. Huang M, Wang W. Factors affecting alum-protein interactions. *Int J Pharm.* 2014;466(1-2):139-46.
17. Wang W, Singh M. Selection of Adjuvants for Enhanced Vaccine Potency. *World J Vaccines.* 2011;1(2):33-78.
18. Hem SL, Hogenesch H. Relationship between physical and chemical properties of aluminum-containing adjuvants and immunopotentiality. *Expert Rev Vaccines.* 2007;6(5):685-98.
19. Jully V, Frédéric M, Nicolas M, Véronique P, Lemoine D, Mathot F, et al. Mechanisms of Antigen Adsorption Onto an Aluminum-Hydroxide Adjuvant Evaluated by High-Throughput Screening. *J Pharm. Sci.* 2016;105(6):1829-36.
20. Hansen B, Sokolovska A, HogenEsch H, Hem SL. Relationship between the strength of antigen adsorption to an aluminum-containing adjuvant and the immune response. *Vaccine.* 2007;25(36):6618-24.
21. Iyer S, Robinett RSR, HogenEsch H, Hem SL. Mechanism of adsorption of hepatitis B surface antigen by aluminum hydroxide adjuvant. *Vaccine.* 2004;22(11-12):1475-9.

Adsorption conditions of a vacunal candidate based on outer membrane vesicles of *Salmonella* Paratyphi A in aluminum adjuvants

Abstract

The immunostimulation capacity of most vaccines is enhanced through antigen adsorption on aluminum adjuvants. The changes in adsorption conditions (pH, adsorption time), could change the amount of antigen adsorbed and therefore the ability to stimulate the immune system. The Finlay Institute of Vaccine researches a new vaccine candidate based on outer membrane vesicle from *Salmonella* Paratyphi A (OMV-SPA). The study aim was to determine adsorption condition of OMV-SPA with two aluminium adjuvants (Al(OH)₃ and AlPO₄). OMV-SPA was adsorbed in both adjuvants under differences conditions of pH and time. Parameters as adsorptive capacity (qm) and adsorption coefficient (Kd) were determined by construction of Langmuir Isotherm. The lot of OMV-SPA used is composed by population of nanostructure with a particle size between 60 and 100 nm. Adsorption of OMV-SPA in both adjuvants showed values $\geq 95\%$ in neutral pH (6.5-7.0). OMV-SPA with AlPO₄ got equilibrium state in less time (99% from 30 min) compared with Al(OH)₃ (95% from 3 h). Isotherms from both adjuvants described Langmuir model ($R^2 \geq 0.99$), with qm and Kd values very different between adsorption systems. As conclusion, the study showed that OMV-SPA was adsorbed satisfactorily in both aluminium adjuvants, process in which are involved different adsorption mechanism.

Keywords: *Salmonella* Paratyphi A; adsorption; adjuvants; aluminum hydroxide; aluminum phosphate.
