

DISEÑO DE UNA FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE VACUNAS

Design of a Liposomal Formulation Aimed to Vaccines Administration

Óscar DELGADO RUBIO; M.^a José de JESÚS VALLE; Amparo SÁNCHEZ NAVARRO
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Salamanca.
C/ Méndez Nieto, s/n. Salamanca. Teléfono: 923 294536. Fax: 923 294515
Correo-e: asn@usal.es

RESUMEN: Los efectos de una vacuna dependen no solo del antígeno, sino también de factores relacionados con la formulación; la elección del sistema de liberación junto con el empleo de potenciadores inmunológicos son aspectos de gran relevancia. Actualmente existen numerosas estrategias en desarrollo en este campo basadas en la utilización de liposomas. El objetivo de este trabajo ha sido el diseño y la preparación de un vehículo para la administración de vacunas, capaz de liberar inmediatamente el coadyuvante y más lentamente el antígeno. Analizando los conocimientos previos se realizó, en una primera fase, el diseño teórico del vehículo y seguidamente la preparación y caracterización del mismo. La «formulación propuesta» se basa en la microencapsulación de liposomas, constituidos por fosfatidilcolina, colesterol y dimetildioctadecil amonio, con albumina bovina. El procedimiento experimental aplicado, que transcurre en ausencia de disolventes orgánicos, permite obtener liposomas con un potencial zeta de $61,9 \pm 2,08$ mV y tamaño entre 20 y 70 nm así como su inclusión en partículas esféricas de albúmina, cuyo rango de tamaño resultó ser de 2-10 μm . Con estas características el vehículo no podría administrarse por vía parenteral pero sí nasal o transdérmica.

Palabras clave: liposomas; vacunas; microesferas de albúmina.

ABSTRACT: Antigen is not the single component involved in the pharmacological response for vaccines but additional factors such as formulation and adjuvant compounds play a relevant role. Several strategies based on the use of liposomes are currently assayed in this field. According to this, the aim of the present work was the design, preparation and characterization of a pharmaceutical vehicle able to produce a rapid delivery of adjuvants and a slow release of antigen. From the *know-how* a theoretical vehicle was design and proposed as optimal formulation and this was then prepared and characterized. The «proposed formulation» is based on albumin coated liposomes made of egg phosphatidylcholine, cholesterol and diethyldodecylammonium. The applied procedure carried out in absence of organic solvents allowed for obtaining liposomes with a 20-70 nm aerodynamic diameter range and a zeta potential mean value of 61.9 ± 2.08 mV and also for its coating with albumin. Coated particles showed a spherical shape and a size range of 2-10 μm which does not fulfil parenteral formulations requirements but are optimal for nasal or dermatological administration routes.

Key words: Liposomes; Vaccines formulation; Albumin microspheres.

INTRODUCCIÓN

La investigación y el desarrollo de nuevas vacunas es, hoy en día, uno de los campos con importantes perspectivas de futuro en el ámbito biomédico y biofarmacéutico para la prevención de enfermedades infecciosas, así como de otras tan dispares como el cáncer o la enfermedad de Alzheimer.

En esencia, una vacuna es una preparación farmacéutica capaz de producir una respuesta contra un antígeno presente en dicha formulación, activando el sistema inmune y asegurando la protección frente a dicho antígeno en un encuentro posterior.

En el diseño de una vacuna se debe de tener en cuenta mucho más que el antígeno utilizado, siendo un aspecto crucial la elección tanto de un sistema de liberación adecuado como el empleo de elementos que actúen como potenciadores inmunológicos. La combinación de ambos determinará, cuantitativamente y cualitativamente, la respuesta inmunológica que se produzca.

Actualmente existen numerosas estrategias en desarrollo en este campo, siendo los liposomas, estructuras vesiculares microscópicas constituidas por una o más bicapas fosfolipídicas, unos de los vehículos más prometedores. En la bibliografía se cita la idoneidad de dichos vehículos para el diseño de nuevas vacunas debido a su gran versatilidad en la formulación, biocompatibilidad, estabilidad, capacidad

de incorporar moléculas inmunogénicas, así como los beneficios que aportan a nivel terapéutico (Perrie *et al.* 2013).

OBJETIVO

Diseñar y preparar una formulación basada en la utilización de liposomas que constituya un vehículo para la administración de vacunas, capaz de liberar inmediatamente el coadyuvante y más lentamente el antígeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. *Diseño teórico del vehículo*

Se recopiló información sobre la utilización de liposomas en el campo de las vacunas y sobre los agentes adyuvantes de respuesta inmunológica más utilizados en los últimos años. Se analizaron los datos publicados sobre el tema desde el año 2005 recogidos e indexados en la base de datos MEDLINE. Se consideraron ventajas e inconvenientes de las alternativas descritas, se seleccionaron las condiciones más adecuadas y diseñó una formulación biocompatible con capacidad antigénica y potenciales características de liberación secuencial de componentes activos.

2. *Preparación y caracterización de la «Formulación propuesta»*

Para la preparación de liposomas se ensayaron dos métodos: *Método clásico de Bangham* y el *Método de sonicación*, eligiendo este último debido a que no requiere el empleo de disolventes orgánicos, lo que garantiza su exclusión en la formulación evitando, a la vez, la contaminación medioambiental.

– Preparación de liposomas por el método de sonicación:

Se aplicó el método previamente descrito (de Jesús Valle y Sánchez Navarro 2015). Se pesan los componentes: fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol y dimetildioctadecil amonio (DDA) y se mezclan en un vaso pequeño de precipitados con agua miliQ precalentada hasta obtener una dispersión homogénea de lípidos que, posteriormente, se coloca en un baño de ultrasonidos precalentado a 60°C, manteniéndolo durante 15 minutos; seguidamente se centrifuga la mezcla y se recoge el sobrenadante que contiene los liposomas formados. Se separa el sobrenadante y se filtra (0,22 µm) para eliminar las vesículas de tamaño superior. La suspensión de liposomas así obtenida se utiliza para la su encapsulación.

- Encapsulación de liposomas con albúmina
Se mezclan mediante agitación mecánica volúmenes iguales de una disolución de albúmina y del filtrado de liposomas obtenidos por el proceso anteriormente descrito. La mezcla obtenida se mantiene a baja temperatura (4°C) durante 18 h. Transcurrido ese tiempo se producirá una separación de fases con la aparición de un sedimento donde se encuentran los liposomas microencapsulados.
- Caracterización del vehículo
Se emplearon métodos de microscopía óptica para comprobar la formación tanto de liposomas como de microcápsulas. Mediante técnicas de difracción de rayos láser (LSD) se analizó la distribución de tamaños y el potencial zeta de las partículas empleando un ZetaSizer de serie nano y un MasterSizer 2000 para los liposomas y las microcápsulas, respectivamente; también se estudió su morfología mediante microscopía electrónica.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras analizar distintas alternativas, se consideró óptima la propuesta siguiente: liposomas constituidos por fosfatidilcolina de huevo (EPC), colesterol (Chol) y dimetildioctadecil amonio (DDA) y su microencapsulación con albúmina bovina. Todos los componentes de la formulación, a excepción del DDA, son productos naturales, inocuos ampliamente utilizados en el campo de la tecnología farmacéutica. Los liposomas actuarían, a la vez, como portadores del antígeno y como inmunomoduladores.

Como adyuvante se seleccionó el dimetildioctadecil amonio (DDA), lípido catiónico, que proporciona una mayor respuesta inmune. Su mecanismo de acción se debe a la vectorización de los antígenos hacia la membrana de las células presentadoras de antígenos (Smith Korsholm *et al.* 2007). También se ha demostrado que las vesículas con DDA interaccionan más rápidamente con las células (Carmona-Ribeiro 2000). Cabe destacar que en múltiples referencias bibliográficas se hace mención a la acción inmunoestimulante de las vesículas catiónicas, afirmándose que los liposomas catiónicos son capaces de activar varias vías celulares como pueden ser cascadas pro-apoptóticas o pro-inflamatorias, debido a que la existencia de cargas positivas cerca de la superficie celular es reconocida como una señal de peligro (Landesman-Milo y Peer D 2012). Además del DDA, como agente adyuvante principal, se propone la inclusión de colesterol, ya que existen estudios que demuestran que su incorporación en los liposomas produce un aumento de las tasas de transfección y una mayor inmunogenicidad (Kaur *et al.* 2014).

Para conseguir una liberación prolongada y sostenida de estos liposomas se propone su encapsulación con albúmina bovina. La mezcla de liposomas encapsulados y sin encapsular proporciona un vehículo potencialmente capaz de liberar de forma rápida el adyuvante junto con parte del antígeno y de forma lenta y sostenida el antígeno, lo que provocaría la activación inmediata del sistema inmune junto con la producción prolongada de anticuerpos (Van Riet *et al.* 2014).

Para la preparación de los liposomas se ensayaron diferentes condiciones experimentales y se observó que al incluir DDA el tamaño es menor debido, probablemente, a las interacciones electrostáticas con los otros componentes. Por otro lado se comprueba que el tamaño de los liposomas es mayor y más heterogéneo cuando se preparan por el método de Bangham, independientemente de la presencia o ausencia de DDA. Mediante microscopía óptica se confirma que el método de sonicación conduce a la formación de vesículas lipídicas de tamaño homogéneo. Las seleccionadas para su inclusión en el vehículo (obtenidas por sonicación con DDA) presentaron un rango de tamaño de 20-70 nm y un valor medio de potencial zeta de $61,9 \pm 2,08$ mV, estimado a partir de las curvas de distribución para los 4 lotes (figura 1).

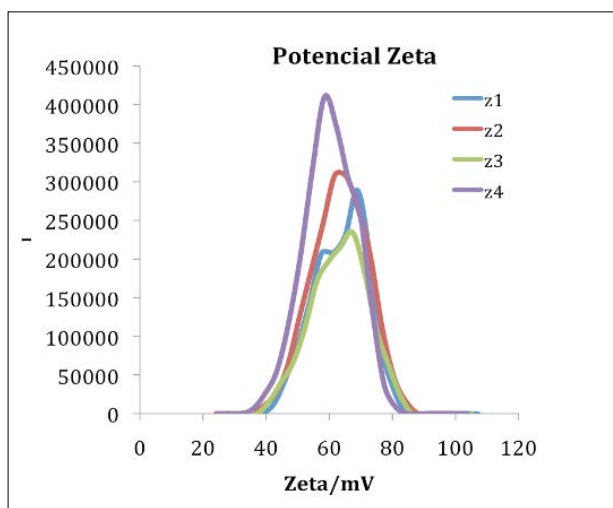


FIGURA 1: Curvas de distribución del potencial zeta de los liposomas.

Cuando se incubaron los liposomas con albúmina se observó una separación de fases con aparición de un sedimento cuya observación reveló la formación de partículas cuya morfología, caracterizada por microscopía electrónica, se muestra en la figura 2.

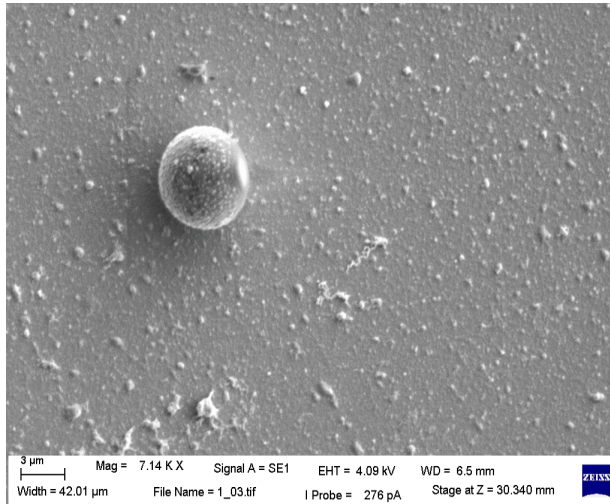


FIGURA 2: Microesfera de albúmina caracterizada por microscopía electrónica.

El análisis de distribución de tamaño de las partículas esféricas obtenidas se muestra en la figura 3, que incluye las curvas para los cuatro lotes preparados utilizando albúmina al 1%. Se observa una baja variabilidad inter-lote con un rango de tamaños de 2-10 µm para el 99% de las partículas.

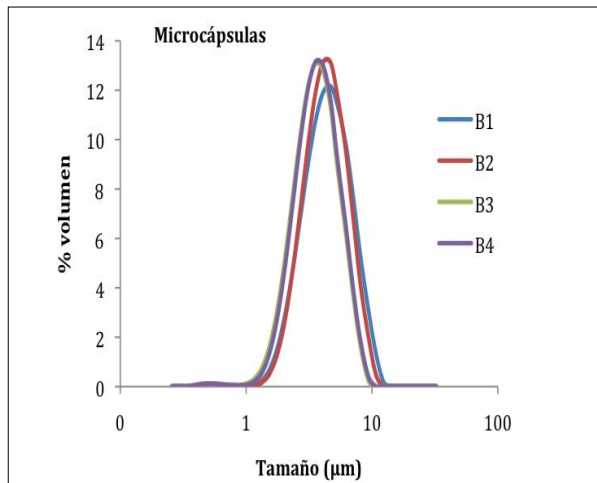


FIGURA 3: Curvas de distribución de tamaño de las microcápsulas obtenidas.

El tamaño de las microesferas obtenidas es superior al requerido para formulaciones parenterales, por lo que se realizaron pruebas con otras concentraciones de albúmina (0,5% y 0,1%). Los resultados demuestran una reducción del tamaño a medida que disminuye la concentración de albúmina; sin embargo, se necesitan estudios adicionales para determinar las condiciones que permitan obtener partículas de tamaño adecuado para su administración por vía parenteral.

Aunque inicialmente se planteó el diseño de un vehículo para su administración por esta vía, cabe señalar que las microcápsulas obtenidas con las condiciones iniciales seleccionadas (albúmina al 1%) presentan un tamaño válido para vías no parenterales y se plantean como una interesante opción para la vía nasal o transdérmica (Amorij *et al.* 2014).

CONCLUSIONES

El tamaño de los liposomas depende del método de fabricación utilizado, siendo el de sonicación el elegido para obtener liposomas de menor tamaño.

La inclusión de DDA como uno de los componentes de los liposomas produce una reducción del tamaño de las vesículas lipídicas para ambos métodos de preparación ensayados.

El procedimiento aplicado para la microencapsulación de liposomas con albúmina es reproducible, ya que se obtienen curvas de distribución de tamaño monodispersas y superponibles para los 4 lotes preparados.

La microencapsulación con albúmina al 1% conduce a la formación de microesferas con un rango de diámetro de 2-10 μm , que no es adecuado para su administración parenteral, pero sí nasal o transdérmica.

La inclusión de los liposomas encapsulados y sin encapsular en una formulación proporciona un vehículo con potencial de liberación controlada en el campo de las vacunas.

BIBLIOGRAFÍA

- AMORIJ, J. P., KERSTEN, G. F., SALUJA V., TONNIS, W. F., HINRICHS, W. L. J., SLÜTTER, B., *et al.*: Towards tailored vaccine delivery: Needs, challenges and perspectives. *J Control Release*. 2012;161(2):363-7.
- CARMONA-RIBEIRO, A. M.: Interactions between cationic liposomes and drugs or biomolecules. *An Acad Bras Cienc*. 2000;72:39-43.
- DE JESÚS VALLE, M. J. y SÁNCHEZ NAVARRO, A.: Liposomes Prepared in Absence of Organic Solvents: Sonication Versus Lipid Film Hydration Method. *Current Pharm Analysis*. 2015;11(2):86-91.

- KAUR, R., HENRIKSEN-LACEY, M., WILKHU, J., DEVITT, A., CHRISTENSEN, D. y PERRIE, Y.: Effect of incorporating cholesterol into DDA:TDB liposomal adjuvants on bilayer properties, biodistribution, and immune responses. *Mol Pharm.* 2014;11:197-207.
- LANDESMAN-MILO, D. y PEER, D.: Altering the immune response with lipid-based nanoparticles. *J Control Release.* 2012;161(2):600-8.
- PERRIE, Y., KASTNER, E., KAUR, R., WILKINSON, A. y INGHAM, A. J.: A case-study investigating the physicochemical characteristics that dictate the function of a liposomal adjuvant. *Hum Vaccines Immunother.* 2013;9(6):1374-81.
- SMITH KORSHOLM, K., AGGER, E. M., FOGED, C., CHRISTENSEN, D., DIETRICH, J., ANDERSEN, C. S., *et al.*: The adjuvant mechanism of cationic dimethyldioctadecylammonium liposomes. *Immunology.* 2007;121:216-26.
- VAN RIET, E., AINAI, A., SUZUKI, T., KERSTEN, G. y HASEGAWA, H.: Combatting infectious diseases; Nanotechnology as a platform for rational vaccine design. *Adv Drug Deliv Rev.* 2014;74:28-34.