

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**Adjuvantes e via de administração no
desenvolvimento de vacinas**

Beatriz de Brito Custódio

Monografia orientada pela Professora Doutora Lúcia Maria Diogo Gonçalves,
Investigadora Principal.

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2021

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



**Adjuvantes e via de administração no
desenvolvimento de vacinas**

Beatriz de Brito Custódio

**Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas apresentada à
Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

Monografia orientada pela Professora Doutora Lídia Maria Diogo Gonçalves,
Investigadora Principal.

2021

Resumo

Esta monografia pretende sintetizar os principais conceitos para o desenvolvimento de novos adjuvantes, novas associações de adjuvantes e novas aplicações para adjuvantes já existentes em vacinas. Os adjuvantes podem potenciar a eficácia e segurança de uma vacina, assim como reduzir a sua toxicidade promovendo uma imunidade mais robusta relativamente às vacinas empregues nas últimas décadas, sendo a maioria adjuvada com sais de alumínio.

De forma a compreender o papel dos adjuvantes na relação entre a imunidade protetora e as vacinas é importante compreender o mecanismo de ação, os fatores que o influenciam e as diferentes respostas desencadeadas pela ativação dos *Toll-like Receptors* consoante cada adjuvante. Esta é uma área de extensa investigação que visa alcançar o adjuvante ideal, orientado às propriedades da respetiva indicação terapêutica, capaz de estimular uma resposta imunitária forte celular e humoral, sem reatogenicidade.

Serão mais abordadas as vacinas dentro do contexto clínico vacinal português e perante as doenças virais mais incidentes a nível global, e foi enquadrado sempre que possível, as vacinas comercializadas e em estudo nas respetivas categorias de adjuvantes, explicando como cada uma se manifesta no seu envolvimento na ativação da resposta imunitária.

Os adjuvantes mais aprofundados são respetivamente: sais de alumínio, QS-21, ISCOMs, MPLA, MF59, IL-12, MPI, CpG ODNs, AS04 e Algammulin.

As abordagens racionais de otimização e produção de vacinas, em sinergia com as evidências científicas mais promissoras, a convergência de perspetivas dos vários campos de investigação e a seleção dos sistemas de administração conforme o cenário mais pertinente podem permitir a preparação racional e inteligente de formulações de vacinas com as propriedades imunoestimulantes procuradas, tamanho das partículas, e carga antigénica. Assim o adjuvante ideal estará cada vez mais próximo de ser formulado e terá um impacto tremendo na imunização da população contra doenças infecciosas.

Palavras-chave: (1) Categorias de Adjuvantes, (2) Vacinas, (3) Imunidade, (4) Doenças infecciosas, (5) Sais de alumínio.

Abstract

This abstract aims to summarize the main concepts for the development of new adjuvants, new associations of adjuvants and new applications for existing adjuvants in vaccines. Adjuvants can enhance the efficacy and safety of a vaccine, as well as reduce its toxicity to promote more robust immunity than the vaccines employed in the last decades, most of which were adjuvated with aluminum salts.

In order to understand the role of adjuvants in the relationship between protective immunity and vaccines it is important to understand the mechanism of action, the factors that influence it and the different responses triggered by activation of Toll-like receptors depending on each adjuvant. This is an area of extensive research that aims to achieve the ideal adjuvant, targeted to the properties of the respective therapeutic indication, able to stimulate a strong cellular and humoral immune response without reactogenicity.

Vaccines within the Portuguese vaccine clinical context and considering the most incident viral diseases globally will be further explored. Whenever possible, the vaccines on the market and under study will be framed in their respective adjuvant category, explaining how each one manifests itself in its involvement in triggering the immune response.

The adjuvants that have been further detailed are respectively: aluminum salts, QS-21, ISCOMs, MPLA, MF59, IL-12, MPI, CpG ODNs, AS04 and Algammulin.

Rational approaches to vaccine optimization and production, in synergy with the most promising scientific evidence, the convergence of perspectives of the various research fields, and the selection of delivery systems according to the most pertinent scenario can enable the rational and intelligent preparation of vaccine formulations with the desired immunostimulatory properties, particle size, and antigenic load. Thus, the ideal adjuvant will be getting closer to be formulated and will have a tremendous impact on the immunization of the population against infectious diseases.

Keywords: (1) Adjuvant categories, (2) Vaccines, (3) Immunity, (4) Infectious diseases, (5) Aluminum salts.

Lista de abreviaturas e siglas

A/O	Emulsão simples Água-em-Óleo
A/O/A	Emulsão múltipla Água-em-Óleo-em-Água
AIM	Autorização de Introdução no Mercado
APCs	<i>Antigen-Presenting Cells</i> (Células apresentadoras de Antígenos)
AS01	<i>Adjuvant System 01</i> (Sistema de Adjuvante 01)
AS02	<i>Adjuvant System 02</i> (Sistema de Adjuvante 02)
AS04	<i>Adjuvant System 04</i> (Sistema de Adjuvante 04)
CpG	Sequência linear de cadeia única 5'-C-fosfato-G-3', ou seja, citosina e guanina separadas por apenas um grupo de fosfato
CpG ODN	CpG <i>oligodeoxynucleotides</i> (oligodesoxinucleotídeos CpG, moléculas de DNA sintético de cadeia única curta)
CRM197	<i>Cross Reacting Material 197</i>
CT	<i>Cholera toxin</i> (Toxina da cólera)
CTLs	<i>Cytotoxic Lymphocytes</i> (Linfócitos T citotóxicos)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido Desoxirribonucleico)
dsRNA	<i>double - stranded RNA</i> (material genético de vírus de RNA de cadeia dupla)
DT	<i>Diphtheria Toxoid</i> (Toxóide Diftérico)
DTPa	Toxóide diftérico (D), Toxóide tetânico (T), Toxóide e subunidades de <i>Bordetella pertussis</i> (Pa)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Autoridade reguladora do medicamento dos Estados Unidos)
GM-CSF	<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i> (Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)
HA	Hemaglutinina
HBsAg	Antigénio de superfície do vírus da hepatite B, indica infecção
HE	Hemaglutina-Esterase
Hib	<i>Haemophilus influenzae</i> do tipo b
HIV-1	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> do tipo 1
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (Papilomavírus Humano)
HPV16	Um dos dois tipos de HPV (16 e 18) causadores de 70% dos tumores cervicais e lesões cervicais pré-cancerosas por HPV
Hsp60/70	<i>Heat shock proteins 60 and 70</i>

IFN	Interferão (tipo I, II, III), proteínas de sinalização da família de citosinas libertadas por células hospedeira na presença de vírus
IgA	Imunoglobulina A, proteína encontrada em grandes quantidades nas mucosas, principalmente na mucosa respiratória e gastrointestinal
IgE	Imunoglobulina E, anticorpo importante na imunidade ativa contra parasitas helmintos e responsáveis pelos fenómenos anafiláticos
IgG	Imunoglobulina G, anticorpo que o organismo produz quando entra em contato com algum tipo de microrganismo invasor, num momento mais tardio da fase aguda da infeção
IgM	Imunoglobulina M, primeiro anticorpo a ser produzido quando há uma infeção, considerado um marcador de fase aguda
IL-12	Interleucina 12, citocina secretada pelos linfócitos B, neutrófilos, células dendríticas e macrófagos após a ativação por APCs
ISCOMs	<i>Immunestimulating complexes</i> (Complexos Imunoestimuladores)
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> (Lipossacárido)
LT	<i>Heat-labile toxin</i> (Enterotoxina lábil ao calor da <i>Escherichia coli</i>)
MDP	Muramil dipeptídeo, N-acetil muramil-l-alanil-d-isoglutamina
MF59	Emulsão O/A contendo esqualeno (4,3%) em tampão ácido cítrico com tensoativos não-iónicos estabilizadores Tween 80 (0,5%) e Span 85 (0,5%)
MMTV	<i>Mouse mammary tumor virus</i>
MPI	Micropartícula de inulina
MPL	Monofosforilo lipídico A
mRNA	RNA mensageiro
MVA	Vírus <i>Vaccinia Ankara</i> modificado
MVA85A	Antigénio micobacteriano MVA 85A
NA	Neuraminidase
O/A	Emulsão Óleo-em-água
OVA	Ovalbumina, proteína encontrada na clara de ovo
PAMPs	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i> (Padrões moleculares associados a patogénios)
PEG	Polietilenoglicol
PLGA	<i>Poly lactide-co-glycolide</i> (poli (lático-co-glicólico))

PRRs	<i>Pattern recognition receptors</i> (Recetores de Reconhecimento de agentes Patogénicos)
PVP	Polivinilpirrolidona
QS-21	Fracção activa da casca de <i>Quillaja saponaria</i> , purificada por cromatografia de fase reversa, sendo o número 21 a identificação do pico RP-HPLC
Quil A	Saponina isolada do córtex da árvore sul-americana <i>Quillaja saponaria</i> Molina
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)
RSV	<i>Respiratory syncitial virus</i>
ssDNA	<i>single - stranded</i> DNA (material genético de DNA de cadeia única)
ssRNA	<i>single - stranded</i> RNA (material genético de RNA de cadeia única)
TDM	Trealose de dimicolato
Tfh	Células T <i>follicular helper</i>
Th	Células T <i>helper</i>
Th1	Células T <i>helper</i> do tipo 1
Th2	Células T <i>helper</i> do tipo 2
TLRs	<i>Toll-like receptors</i> (Recetores tipo <i>Toll</i>)
TT	<i>Tetanus toxoid</i> (Toxóide tetânico)
VHA	Vírus da Hepatite A
VHB	Vírus da Hepatite B
VIP	Vírus da poliomielite dos tipos 1, 2 e 3, inteiros e inativados
VLPs	<i>Virus-like particles</i> (Partículas semelhantes a vírus)

Índice

1	INTRODUÇÃO	10
2	PAPEL DO ADJUVANTE NA VACINAÇÃO	11
2.1	Introdução ao mecanismo induzido	11
2.2	Barreiras ao desenvolvimento de adjuvantes.....	13
3	CATEGORIAS DE ADJUVANTES	13
3.1	Sais minerais.....	14
3.2	Compostos tensoativos	15
3.3	Adjuvantes derivados de microrganismos.....	16
3.4	Emulsões.....	16
3.5	Citocinas	18
3.6	Polissacáridos	18
3.7	Adjuvantes à base de ácidos nucleicos	19
3.8	TLRs e os Adjuvantes.....	20
3.9	Formulações de Coadjuvantes	21
4	CONCLUSÃO	22
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

Índice de Tabelas

Tabela 1	Vacinas no mercado e adjuvante que contêm	14
Tabela 2	TLRs, os seus ligantes e respetiva especificidade relativa aos adjuvantes.....	21
Tabela 3	Exemplos de vacinas com co-adjuvantes	22

1 INTRODUÇÃO

A vacinação é uma das estratégias mais bem-sucedidas e rentáveis na história da medicina e é um direito e dever de cada cidadão, para com a sua saúde, Saúde Pública e cidadania. Para dar resposta aos desafios da modernidade, da informação (e desinformação) e reorganização dos serviços de saúde, programas como o Plano Nacional de Vacinação e recomendações extra Plano Nacional de Vacinação têm vindo a ser reforçados nos últimos anos, de forma a manter os excelentes resultados contribuindo de forma positiva para a sociedade (1).

Felizmente, a maioria das gerações não conhece pessoalmente nenhum caso de difteria, poliomielite ou outras doenças infecciosas que outrora eram encontradas de forma comum, e agora são prevenidas pela vacinação. Embora seja um sinal de sucesso, muitos interrogam-se porque é que os seus filhos têm de receber vacinas contra doenças que parecem já não existir. Mitos e desinformação sobre a segurança de vacinas existem e têm contribuído para confundir os pais que tentam tomar decisões conscientes e acertadas sobre os cuidados de saúde. Nos últimos anos, as vacinas têm contribuído para o aumento da esperança média de vida, conferindo imunidade protetora à população a longo prazo, salvando milhões de vidas e a eventual erradicação de algumas doenças infecciosas virais e bacterianas. No entanto, a elevada cobertura da imunização contra estas doenças não deve ser tomada como adquirida. Um programa de vacinação bem-sucedido, e uma sociedade de sucesso, depende da cooperação de cada indivíduo para assegurar o bem de todos.

O objetivo da vacinação é gerar uma forte resposta imunitária que proporcione uma proteção a longo prazo contra a infeção. As vacinas até hoje foram bastante bem-sucedidas na proteção contra uma variedade de doenças e reduziram drasticamente o número de infeções graves, como, a poliomielite, sarampo, difteria, tosse convulsa, tétano e febre amarela. Existe até o exemplo da imunização global contra a varíola, que levou à erradicação da doença por completo e prevenção de 5 milhões de mortes por ano (2). Em tempos, a maioria das vacinas consistia em agentes patogénicos vivos atenuados, inativados ou toxóides. Ao contrário das vacinas vivas atenuadas, as vacinas de organismos inteiros ou subunidades requerem geralmente a adição de um adjuvante para serem eficazes. A vacina ideal deve ser não reatogénica, isto é, não causar efeitos adversos indesejáveis, fácil de administrar, altamente imunogénica e com imunidade de longa duração, o que nem sempre se verifica. A fim de otimizar a eficácia e segurança das vacinas, os adjuvantes estão incluídos na maioria das suas formulações.

Alguns aspetos a serem considerados na seleção do adjuvante, são: o antigénio, a via de administração e possibilidade de efeitos adversos. Idealmente, o adjuvante deve ser estável e

de boa conservação a longo-prazo, biodegradável, sem grandes custos de produção, inerte imunologicamente e adjuvar o antigénio para melhorar uma resposta imunitária celular e humoral específica à proteção pretendida. Os adjuvantes marcam a diferença na eficácia e segurança das vacinas, não só pela sua presença ou ausência, pelo adjuvante selecionado, como também consoante a via de administração e respetivo sistema de entrega na mesma formulação, por exemplo, as diferenças registadas entre a administração por vias mucosas ou parentéricas (3). Logo, novos vetores, sistemas de administração de antigénios ou adjuvantes a serem desenvolvidos necessitam de ter em conta as características da via de administração proposta. Por exemplo, a imunização intradérmica ou subcutânea é bastante mais eficaz que a via intramuscular, contudo as vacinas com sais de alumínio são administradas apenas via intramuscular devido à sua toxicidade local.

A importância da presença do adjuvante pode-se dividir em quatro grandes motivos: (1) melhorar a imunogenicidade de antigénios altamente purificados ou recombinantes; (2) reduzir a quantidade de antigénio, e conseqüentemente o número de doses necessárias para atingir a imunidade protetora, que se traduz numa redução de custo e maior adesão ao regime vacinal pelo paciente; (3) melhorar a eficácia das vacinas em recém-nascidos, idosos ou grupos imunocomprometidos; e (4) otimizar sistemas de entrega de antigénios para a absorção pela mucosa.

As mais recentes pesquisas sobre adjuvantes, que serão abordadas neste trabalho consistem nos aspetos relativos às recomendações regulamentares, categorias de adjuvantes, como: sais minerais, compostos tensioativos, adjuvantes derivados de microorganismos, emulsões, citocinas, polissacáridos, adjuvantes baseados em ácidos nucleicos e o papel dos recetores *Toll-like*, com foco no seu envolvimento na ativação imunitária (3).

2 PAPEL DO ADJUVANTE NA VACINAÇÃO

2.1 Introdução ao mecanismo induzido

As vacinas podem consistir em agentes patogénicos vivos atenuados ou inativados, proteínas purificadas, ou subunidades com base em porções de antigénios (ou seja, péptidos ou hidratos de carbono) que devem suscitar respostas imunitárias específicas. As vacinas virais atenuadas vivas imitam uma infeção natural. No que respeita à utilização de vacinas com agentes patogénicos completos, as vacinas de subunidades são geralmente mais seguras de administrar, mas são também geralmente menos imunogénicas. As vacinas compostas de

componentes virais purificados como os VLPs, requerem a inclusão de adjuvantes a fim de potenciar a sua atividade imunoestimuladora, caso contrário podem não desencadear suficientemente a resposta imunitária inata que é necessária para estimular da melhor forma o sistema imunitário adaptativo. Para ultrapassar estas questões, podem ser adotadas abordagens, tais como: o uso de adjuvantes, por exemplo, sais de alumínio, esqualeno (MF59, o primeiro adjuvante óleo-em-água a ser comercializado para a vacina contra a Influenza sazonal), agonistas dos TLRs (*Toll-like receptors*) e MPLA (monofosforilo lipídico A); a conjugação do antigénio a uma proteína transportadora imunogénica (por exemplo, a proteína TT (*Tetanus toxoid*), a proteína DT (*diphtheria toxoid*) e a sua forma geneticamente desintoxicada CRM197) ou utilização de transportadores que possam exibir cópias multivalentes de antigénios, induzindo uma resposta imunitária mais forte (4).

O principal mecanismo da atividade imunomoduladora adjuvante é baseado no recrutamento de APCs para o local de administração. As APCs desempenham um papel primordial na imunoestimulação através da captura e processamento de antigénios vacinais e da migração para os gânglios linfáticos drenantes, onde estimulam a proliferação e diferenciação das células T e B. As células Th (*T helper*) CD4⁺ ativadas secretam citocinas que são fundamentais para sinalizar e orientar a estimulação de um tipo específico de resposta imunológica, bem como a maturação de células B e respetiva produção de anticorpos. O tipo específico de resposta Th é importante para a eficácia da imunidade protetora: a resposta do tipo Th1 (*T helper* do tipo 1) é uma resposta a agentes patogénicos intracelulares, tais como vírus e bactérias. Já a resposta do tipo Th2 (*T helper* do tipo 2) está envolvida na estimulação da produção de anticorpos dirigidos contra agentes infecciosos extracelulares. A ativação das células Tfh (*T follicular helper*) estimula a transformação das células B em plasmócitos para a produção de anticorpos. No que diz respeito aos linfócitos T citotóxicos, CTLs (*Cytotoxic T-Lymphocytes*), ou células CD8⁺, destroem as células infetadas, essenciais para bloquear a replicação de bactérias e vírus intracelulares.

Durante a seleção do adjuvante, é fundamental ter em conta a sua especificidade e mecanismo de ação, bem como a sua especificidade sobre as populações de células T. Mais importante ainda, o adjuvante precisa de ser bem tolerado sem provocar efeitos secundários significativos, aumentar a magnitude e duração da imunidade específica, manter a segurança e reduzir a dose de vacina necessária. O desenvolvimento de vacinas para os imunocomprometidos, tais como pacientes idosos ou pediátricos, pode beneficiar dos estudos no desenvolvimento de novos adjuvantes.

2.2 Barreiras ao desenvolvimento de adjuvantes

Apesar da descoberta subsequente de muitos outros adjuvantes consideravelmente mais potentes, entre os primeiros, chegou-se à conclusão de alguns seriam inadequados para uso humano devido à toxicidade local e sistêmica, por exemplo: o FCA (*Freund's complete Adjuvant*) e LPS (*Lipopolysaccharide*). Os problemas de toxicidade de uns adjuvantes tornaram-se a oportunidade para outros, o que resultou numa área livre e disponível para os adjuvantes já autorizados e conseqüentemente numa vasta utilização e desenvolvimento para os sais de alumínio durante décadas. Contudo, a janela de requisitos regulamentares tem sido cada vez mais extensa e rigorosa desde o aparecimento do hidróxido de alumínio como adjuvante (desde 1920).

Vacinas que foram retiradas do mercado têm desafiado a percepção pública da segurança associada à sua administração e tem um impacto contínuo no campo regulamentar. Como exemplo temos a vacina inativada intranasal contra a influenza, associada a um aumento do número de casos de paralisia de *Bell* pela enterotoxina da *Escherichia coli* (3).

Os benefícios da incorporação de adjuvantes numa vacina precisam de ser equilibrados contra o risco de efeitos adversos: Locais (tais como, dor, inflamação local, inchaço, necrose do local de injeção, linfadenopatia, granulomas, úlceras, geração de abscessos estéreis) e sistêmicos (náuseas, febre, artrite adjuvante, alergia, anafilaxia, toxicidade específica dos órgãos, imunotoxicidade).

3 CATEGORIAS DE ADJUVANTES

Os adjuvantes podem ser divididos em várias categorias: (1) Sais minerais; (2) Componentes tensioativos; (3) Adjuvantes derivados de microrganismos; (4) Emulsões; (5) Citocinas; (6) Polissacáridos; (7) Adjuvantes à base de ácidos nucleicos; (8) Agonistas dos TLRs (*Toll-like receptors*); e (9) Coadjuvantes de formulação. Os adjuvantes foram esquematizados pelo contexto histórico, apresentados enquanto sistemas de entrega de antigénios e consoante os mais recentes desenvolvimentos nas vacinas autorizadas no mercado e em estudo, havendo exemplos atuais de vacinas em cada categoria sempre que considerado pertinente.

3.1 Sais minerais

Os adjuvantes à base de sais de alumínio, representam um dos primeiros desenvolvidos para a formulação de vacinas e estão em uso desde os anos 20. Estes adjuvantes são preparados utilizando sais de alumínio insolúveis (por exemplo, fosfato de alumínio, hidróxido de alumínio e hidróxido de alumínio) tendo sido os adjuvantes mais utilizados. Milhões de doses de vacinas com adjuvantes de sais de alumínio foram administradas a humanos e outras espécies. Os sais de alumínio formam partículas de cristal capazes de adsorver os componentes da vacina e funcionam como um veículo do antigénio para as APCs. Infelizmente, em algumas situações, os sais de alumínio são adjuvantes relativamente pobres na indução de respostas imunitárias celulares.

Atualmente, sendo os sais de alumínio os adjuvantes mais utilizados, são vários os exemplos de vacinas aprovadas em Portugal que os utilizam, como facilmente podemos observar na seguinte Tabela 1, em que evidencia os adjuvantes de alumínio na maioria das vacinas recomendadas no Plano Nacional de Vacinação 2020 com exceção das vacinas VASPR contra o sarampo, parotidite epidémica, e rubéola (5).

Tabela 1 Vacinas no mercado e adjuvante que contém

Vacina	Adjuvante
Engerix B	Hidróxido de alumínio
Hexyon (VHB-Hib-DTPa-VIP)	Hidróxido de alumínio
Prevenar (Pn13)	Fosfato de alumínio
Bexsero (MenB)	Hidróxido de alumínio
Pentavac (Hib-DTPa-VIP)	Hidróxido de alumínio
Meningitec (Menc)	Fosfato de alumínio
Tetravac (DTPa-VIP)	Hidróxido de alumínio
Gardasil 9 (HPV)	Sulfato de hidróxifosfato de alumínio
D.T.Vax (Td)	Hidróxido de alumínio
Boostrix (Tdpa)	Hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio

São vários os exemplos: (1) Engerix B (VHB1): Antigénio adsorvido em hidróxido ou sais de alumínio; (2) Hexyon (VHB-Hib-DTPa-VIP): Antigénios adsorvidos em hidróxido e/ou fosfato de alumínio; (3) Prevenar (Pn13): Antigénios adsorvidos em fosfato de alumínio; (4) Bexsero (MenB): Adsorvida em hidróxido de alumínio; (5) Pentavac (Hib-DTPa-VIP): Antigénios

adsorvidos em hidróxido de alumínio; (6) Meningitec (Menc): Antígenos adsorvidos em hidróxido ou fosfato de alumínio; (7) Tetravac (DTPa-VIP): Antígenos adsorvidos em hidróxido de alumínio; (8) Gardasil 9 (HPV): Antígenos adsorvidos em sulfato de hidróxifosfato de alumínio; (9) D.T.Vax (Td): Antígenos adsorvidos em hidróxido de alumínio; e (10) Boostrix (Tdpa): Antígenos adsorvidos em hidróxido e/ou fosfato de alumínio (6).

Alternativamente, os sais de cálcio, ferro e zircónio também têm sido utilizados para adsorver antígenos em estudos de investigação. Em particular, o fosfato de cálcio tem sido utilizado para vacinas contra a difteria - tétano - tosse convulsa nestes estudos (3).

3.2 Compostos tensioativos

Entre os compostos tensioativos é de realçar a QS-21, uma saponina derivada do Quil A, um produto natural composto por mais de 23 saponinas diferentes, oriunda de um extrato aquoso de *Quillaja saponaria*. Quil A é um composto demasiado tóxico para uso humano, contudo as frações purificadas deste extrato por cromatografia de fase reversa, tais como QS-21, têm sido aplicadas em estudos pré-clínicos e algumas formulações de coadjuvantes. QS-21 tem a capacidade de induzir fortes respostas celulares contra alguns antígenos derivados de agentes patogénicos, os efeitos secundários associados à QS-21 limitam as doses a cerca de 50 µg, com exceção do doente com cancro (melanoma, mama e próstata). Caso fosse possível aumentar as doses deste adjuvante em segurança, a sua imunogenicidade seria ainda maior. QS-21, embora não seja tão tóxica como o Quil A, tem muitos dos mesmos problemas e é igualmente imprópria para a maioria das utilizações humanas.

Ainda assim, foram realizados estudos que demonstraram os seus efeitos quando co-formulado com sais de alumínio, lipossomas e emulsões de O/A, e com proteínas e lípidos formando complexos imunestimulantes (ISCOMs). O Sistema Adjuvante (AS) desenvolvido pela GlaxoSmithKline demonstrou que os efeitos adversos de QS-21 poderiam ser significativamente reduzidos se QS-21 fosse formulado em AS01 ou AS02 (composto de lipossomas, MPL e QS-21) numa dose de 5 µg, quando comparado com formulações contendo apenas QS-21 na mesma dose, sugerindo que a toxicidade de QS-21 pode ser reduzida quando formulado com outros adjuvantes apropriados (7).

3.3 Adjuvantes derivados de microrganismos

Dada a potente capacidade adjuvante das substâncias bacterianas ou fúngicas de induzir uma resposta imunológica, são consideradas uma fonte de alto potencial para os adjuvantes. Esta indução é mediada através da ativação dos TLRs pela ativação dos sinais de perigo que por sua vez ativam no hospedeiro uma resposta do sistema imunitário. Os microrganismos inativados são demasiado tóxicos para serem utilizados como adjuvantes em humanos. A atividade adjuvante destas bactérias é principalmente mediada por: MDP (*N-acetil muramil-l-alanil-d-isoglutamina*, também chamado Muramil dipéptido); MPLA (Monofosforil lipídico A); e TDM (Trealose de dimicolato) (3).

O MDP aumenta principalmente a imunidade humoral quando incorporado numa solução salina, enquanto incorporado em lipossomas ou misturado com glicerol induz uma forte imunidade celular.

Relembrando que o lípido A é o elemento estrutural do LPS que lhe confere as propriedades adjuvantes, sendo o LPS um composto da parede celular das bactérias Gram-negativas. O MPLA é obtido em condições de baixa acidez, quando o lípido A é hidrolisado retendo a sua capacidade adjuvante, mas com reduzida toxicidade.

TDM, também conhecido como fator corda, é um glicolípido micobacteriano (antigénio acetilado presente em moléculas micobacterianas, representa um fator de virulência) que enquanto adjuvante estimula tanto uma resposta humoral como celular (8).

Das evidências mais importantes e moduladoras no desenvolvimento de adjuvantes foi a descoberta de que o DNA micobacteriano apresenta atividade adjuvante, levando à descoberta de que a atividade adjuvante estava diretamente relacionada com um maior conteúdo de motivos CpG presentes nos ácidos nucleicos bacterianos. O DNA contendo motivos CpG é um dos mais potentes adjuvantes celulares e atua também através da ativação dos TLRs.

3.4 Emulsões

As emulsões são adjuvantes normalmente descritos como dispersões de óleo-em-água (O/A) ou água-em-óleo (A/O). À semelhança dos sais de alumínio, a emulsão é um adjuvante que promove a adsorção de antigénios e estimula o recrutamento de APCs. As emulsões são formuladas com óleos como o esqualeno (por exemplo MF59), ou com óleos minerais (tais como o adjuvante incompleto de Freund (FIA) e Montanide) (3).

Em geral, estes adjuvantes são demasiado tóxicos para o uso da maioria das vacinas profiláticas de indicação para uso humano, embora possam ser consideradas para cancro ou

condições terminais. Os efeitos secundários mais frequentes das emulsões são locais e incluem: reações inflamatórias, granulomas e úlceras.

MONTANIDE™ ISA, é uma emulsão à base de óleo mineral (A/O), e é normalmente formulado como ISA 51 e ISA 720, assim como adjuvante incompleto de Freund é também uma emulsão A/O. As formulações A/O são emulsões de fase oleosa contínua. A seleção do adjuvante considerará o tipo de óleo e o rácio de utilização (de 50% a 70%), dependendo das características desejadas da vacina. A utilidade de Montanide no desenvolvimento de vacinas de uso humano devido à sua reatogenicidade e ao risco de efeitos secundários graves torna-se bastante limitada (9).

Diferentes emulsões como O/A e A/O/A foram desenvolvidas, sendo igualmente potentes, mas com maior estabilidade, menos viscosas e mais fáceis de administrar, o que representa também menos efeitos secundários locais, em especial granulomas.

No entanto, existe uma emulsão que se destaca das restantes por ter impulsionado uma imunização bastante mais robusta ao vírus da Influenza: O MF59 é uma emulsão de O/A que já demonstrou ser eficaz e segura em várias vacinas. Tem tido um grande impacto na imunogenicidade contra o vírus da influenza em indivíduos com mais de 65 anos e adultos doentes crónicos. O primeiro ensaio clínico de uma vacina adjuvada com MF59® foi realizado em 1992 pela Novartis, contra o vírus da Influenza. Este adjuvante à base de óleo de esqualeno é amplamente utilizado e foi autorizado pela primeira vez para a vacina Flud®[®], em 1997. Primeiro autorizada em Itália, depois a 24 de Novembro de 2015 pela FDA, autoridade reguladora do medicamento dos Estados Unidos, cujo detentor da Autorização de Introdução no Mercado (AIM) foi Seqirus Netherlands B.V. (10). Assim, Flud®[®] é uma marca registada da “Seqirus UK Limited or its affiliates” e MF59®[®] é uma marca registada da Novartis AG (11). MF59 tem um amplo potencial para ser utilizado como um adjuvante seguro e eficaz para uma série de tipos de vacinas (12).

Contudo, até então, o MF59 estava ligado a vacinas que não tiveram sucesso e foi visto como um "fracasso" antes de ser um sucesso, uma vez que muitos adjuvantes alternativos não conseguiram progredir. É importante referir que nunca falhou por razões de segurança e foi sempre bem tolerado. Mesmo perante questões de segurança, MF59 demonstrou que não existem preocupações significativas inclusive em populações imunocomprometidas (3).

3.5 Citocinas

As citocinas podem ter uma função específica nas vacinas de DNA onde a citocina pode ser co-expressa com o antígeno pelo mesmo vetor. Por exemplo, o GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony stimulating factor*) melhora a resposta imunitária primária ativando e recrutando as APCs. Contudo, a aplicação prática do GM-CSF como adjuvante tem sido limitada pela toxicidade e pela imunogenicidade das citocinas heterólogas.

Por outro lado, a aplicação direta de IL-12 e outras citocinas como proteínas solúveis provou ser eficaz como adjuvantes da mucosa (3).

Recentemente foi demonstrado os efeitos adjuvantes da IL-12 coexpressa em DNA otimizando a imunogenicidade do Ag85A em DNA Prime/MVA que demonstrou a capacidade da IL-12 de DNA de melhorar as respostas imunitárias humoral e celular contra o Ag85A induzidas pela imunização com DNA/MVA85A contra a infecção por *Mycobacterium tuberculosis*. Assim, a IL-12 de DNA pode ser considerada como uma ferramenta para a concepção de estratégias de vacina para controlar a infecção de Tuberculose (13).

3.6 Polissacáridos

Vários hidratos de carbono complexos de origem natural, tais como a γ -inulina, estimulam tanto a imunidade humoral como celular. Ativa a via do complemento, aumenta a produção de C3 ativado e consecutivamente a ativação dos macrófagos. A micropartícula de inulina (MPI) é um ativador alternativo potente da via do complemento, ativando assim o sistema imunitário inato. A MPI é particularmente eficaz no reforço das respostas imunitárias celulares sem a toxicidade normalmente demonstrada por outros adjuvantes tais como *Freund's Complete Adjuvant*, Montanide ou QS-21(3). A MPI pode ser combinada com uma variedade de outros adjuvantes para produzir graus variáveis de atividade Th1 e Th2. Sendo capaz de induzir tanto a resposta imunitária Th1 como a Th2, não induz o aumento dos níveis de IgE, e não está associada a qualquer toxicidade local ou sistêmica significativa. Os adjuvantes baseados em MPI têm tido sucesso em muitos modelos animais, incluindo com difteria, TT, proteína E7 de HPV, herpes vírus 2 glicoproteína D, HBsAg, Hemaglutinina da influenza e *Haemophilus influenzae*.

No caso da Algammulin®, por exemplo, um adjuvante para vacinas composto pela combinação de MPI e hidróxido de alumínio, apresenta uma indução Th2 e Th1 superior à de apenas MPI, sendo o seu efeito global equivalente a adjuvantes de alumínio, mas com um teor global de alumínio inferior. A inulina pode ser facilmente metabolizada em frutose e glucose

simples e não apresentando os efeitos adversos associados aos adjuvantes à base de sais de alumínio, e, como tal, também não apresenta as mesmas limitações em termos de segurança e toxicidade. Outros exemplos de polissacáridos tais como glucanos, dextranos e glucomananos melhoram a resposta imunitária (14).

3.7 Adjuvantes à base de ácidos nucleicos

A descoberta da capacidade imunoestimuladora ou imunossupressora do DNA levou a um desenvolvimento de moléculas à base de DNA imunoestimulante. Os motivos CpG são seis sequências longas de desoxinucleótidos de DNA com um dinucleótido CpG central, e ocorrem normalmente no DNA bacteriano vinte vezes mais do que no DNA de mamíferos. O reconhecimento dos motivos CpG requer um TLR9, induzindo a secreção de IFNs de tipo I (α e β) e IL-12 por células do sistema imunitário inato, promovendo uma resposta celular Th1 e prevenindo respostas alérgicas. Existem três principais abordagens em estudo, todas elas relativamente à ligação específica de motivos CpG à molécula TLR9: (1) Desoxinucleótidos imunoestimuladores (ODNs); (2) conjugação ODN - antígeno; e (3) Vetores de vacinas de DNA com sequências imunoestimuladoras otimizadas (3).

Os ODNs são moléculas sintéticas curtas de ssDNA com uma ligação modificada de fosforato, com um ou mais motivos CpG e regiões flanqueadoras variáveis, com uma ativação preferencial de subconjuntos de APCs e padrões de secreção de citocinas em função da combinação dessas sequências específicas, de uma forma dose-dependente. Devido ao seu pequeno tamanho molecular e devido ao efeito resultante da interação do CpG com a molécula TLR 9, mostram maior biodisponibilidade e afinidade para as membranas biológicas. Várias estratégias de vacinação estão em estudo com este tipo de adjuvante, principalmente no campo do cancro e infecções virais. Contudo, a toxicidade pode estar relacionada com a dose, os intervalos de doses e a via de administração dos CpG ODNs (15). Uma vez que os vetores de vacinas de DNA com sequências imunoestimuladoras demonstraram uma eficácia limitada, a introdução dos motivos CpG nas sequências de DNA plasmídeo, otimizava a ativação imunitária da molécula de DNA administrada, fornecendo ao mesmo tempo o gene para expressão e apresentação do antígeno ao sistema imunitário, proporcionando a coestimulação necessária. Este processo genético incluiria também a remoção seletiva de sequências de DNA imunossupressor, contribuindo para a capacidade imunoestimuladora global de toda a molécula (16).

Temos o exemplo da vacina indicada para imunização ativa da Hepatite B administrada via intramuscular para indivíduos adultos ou idade igual ou superior a 18 anos, que induz anticorpos específicos contra o HBsAg. HEPLISAV B é composto pelo antígeno de superfície recombinante da hepatite B e pelo adjuvante CpG 1018, um oligonucleótido de sequência de 22 bases imunoestimulador (17).

3.8 TLRs e os Adjuvantes

Os ativadores dos *Toll-like Receptors* (TLRs) têm sido utilizados como adjuvantes de forma a aumentar as respostas imunitárias das vacinas. Os TLRs são proteínas transmembranas de sinalização expressas pelas células do sistema imunitário (apenas dos mamíferos), mostrando uma ligação específica a ligandos de natureza molecular variada. Estes ligandos são comumente conhecidos como PAMPs – *Pathogen Associated Molecular Patterns*. As questões subsequentemente referidas são principalmente para adjuvantes que se assemelham ao nível da estrutura, assim como potencial de ativação dos PAMPs naturais, como adjuvantes derivados de microrganismos e antígenos vacinais com capacidade adjuvante. Após a ativação do TLR consoante o ligando específico, uma via de sinalização ativa-se, resultando na expressão de genes associados à indução de respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro que controlam a infecção. O sucesso do regime de vacinação depende principalmente da ativação adequada do TLR apropriado, devido à sua distribuição principalmente em populações de monócitos, macrófagos e CD. Está também relacionada com a via e sistema de entrega utilizados, de acordo com as populações de APCs estimuladas, quer através de TLRs ou outros recetores imunitários (18).

Nem todas as famílias de adjuvantes respondem ao mesmo estímulo e da mesma forma, depende dos recetores e do seu processamento: (1) TLRs 1, 2 e 6 são desencadeados como homo ou heterodímeros por peptidoglicanos e outros produtos bacterianos; (2) TLR3 por dsRNA; (3) TLR4 por LPS; (4) TLR5 por flagelina; (5) TLR7/8 por imidazoquinolinas e moléculas de ssDNA; e (6) TLR9 por motivos de CpG-ODNs não metilados (19), como demonstrado na Tabela 2. Por outro lado, a elevada estimulação através de TLRs podem também gerar efeitos tóxicos indesejáveis, como é o caso do Adjuvante Completo de Freund (3). Assim, a dose adjuvante e o mecanismo de ação têm de ser cuidadosamente selecionados sem comprometer o efeito desejável. Podem e estão a ser incluídos na formulação de vacinas agonistas de TLRs para desencadear respostas imunitárias significativas contra um antígeno vacinal se ativarem um sinal coestimulador relevante para a vacina em questão (3).

Tabela 2 TLRs, os seus ligantes e respetiva especificidade relativa aos adjuvantes

Recetor	Ligando natural	Adjuvante
TLR1	Lipopéptidos bacterianos/ micoplasmáticos (com TLR2)	Enterotoxinas termolábeis da E. coli tipo II, lipopéptidos triacilados
TLR2	Peptidoglicanos, ácido lipoteicóico	Derivados do MDP, enterotoxinas de E. coli tipo II, derivados de lipopentapéptidos
TLR3	dsRNA bacteriano e viral	Ácido polinossínico-politidílico
TLR4	Hospedeiro hsp60/70 , LPS , proteína de fusão RSV, proteína de envelope MMTV	Derivados do MDP, MPL sintético
TLR5	Flagelina	Proteínas de fusão de flagelina
TLR6	Lipopéptidos bacterianos/ micoplasmáticos (com TLR2)	Lipopéptidos diacilados (macrófagos ativadores dos lipopéptidos -2)
TLR7	ssRNA bacteriano, viral e hospedeiro	Imiquimod, R-848, ssRNA
TLR8	ssRNA bacteriano, viral e hospedeiro	R-848, ssRNA
TLR9	CpG DNA bacteriano e viral, complexos DNA-IgG, hemozoína palúdica	CpG ODNs

3.9 Formulações de Coadjuvantes

Formulações resultantes da mistura entre pelo menos dois adjuvantes de mecanismos e categorias diferentes têm como objetivo orientar e modular a estratégia da resposta imunológica para dado antigénio, suprimir possíveis reatogenicidades e reunir um conjunto de propriedades favoráveis que um adjuvante não reúne de forma isolada, o que acontece na maioria das formulações de vacinas, como se apresenta na Tabela 3 com algumas das vacinas autorizadas em Portugal (20).

Alguns exemplos de formulações já autorizadas são, o Adjuvante AS04, um adjuvante com a capacidade de estimular o TLR4 que teve um impacto relevante na AIM de duas vacinas com base VLP, Cervarix (para HPV) e Fendrix (para VHB). As vacinas com o adjuvante AS04C são produzidas em células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) por tecnologia de DNA recombinante, inclui o MPL e é adsorvida em fosfato de alumínio (21).

No caso de ISCOMs® e Algammulin®, são dois exemplos de formulações de adjuvantes também desenvolvidos consoante as abordagens acima referidas. Outras formulações foram

concebidas para otimizar sistemas de entrega de antígenos e o seu efeito estimulante, tais como CpG-ODN e MDP encapsulados em lipossomas (3).

Novas formulações de adjuvantes podem ser criticamente relevantes para o desenvolvimento de novas vacinas contra agentes infecciosos causadores de condições patológicas caracterizadas por imunodeficiência e grupos de alto risco (20).

Tabela 3 Exemplos de vacinas com co-adjuvantes

Vacina	Nome comercial	Adjuvante
Gripe	Fluad	MF59C.1 (esqualeno, polissorbato 80, trioleato de sorbitano)
Papilomavírus Humano	Cervarix	AS04 (MPL + hidróxido de alumínio)
Pneumocócica conjugada	Prevenar 13	Polissacáridos conjugados com CRM197 e adsorvidos em fosfato de alumínio
Pneumocócica conjugada	Synflorix	Polissacáridos adsorvidos em fosfato de alumínio e conjugados com proteínas transportadoras

4 CONCLUSÃO

As estratégias mais modernas de concepção e desenvolvimento de vacinas procuram integrar o conhecimento da composição da formulação e a compreensão dos mecanismos imunoestimuladores para gerar respostas imunológicas que de outra forma seriam inatingíveis nas populações alvo. Estes potenciais avanços podem ser fundamentais para vacinas customizadas capazes de corresponder às características únicas do sistema imunitário em desenvolvimento durante o período neonatal, de infância e orientada a grupos de risco.

Para isso é importante continuar a investigar o desenvolvimento de novos adjuvantes para diferentes vacinas: (1) elementos que influenciam a resposta imunitária (tipo de antígeno, conjunto de células alvo e fenótipo apropriado); (2) Mecanismo de reconhecimento e proteção (vias de sinalização e geração de resposta por parte das CTLs); (3) A nível de produção (mais robusta com menos doses de vacina e conseqüente boa relação de custo); e (4) quanto ao sistema de entrega (capacidade de contornar resistências imunitárias e um antígeno capaz de gerar uma proteção de longa duração).

Resumindo, são vários os campos em investigação intensiva: candidatos de vacinas que prometem ser impactantes no futuro clínico de doenças infecciosas, a utilização de estratégias de vacinas combinadas, novos adjuvantes, possível erradicação de doenças infecciosas, avanços

na imunoengenharia dos novos sistemas de administração nomeadamente de novas plataformas de vacinas com grande potencial para progredir na inovação em vacinologia.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Moylett EH, Hanson IC. Mechanistic actions of the risks and adverse events associated with vaccine administration. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114(5):1010–20.
2. CDC. History of smallpox [Internet]. 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/smallpox/history/history.html>).
3. Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25(19):3752–62.
4. Mateu Ferrando R, Lay L, Polito L. Gold nanoparticle-based platforms for vaccine development. *Drug Discov Today Technol* [Internet]. 2021;xxx(xx):1–11. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2021.02.001>
5. Infarmed. RCMs [Internet]. Available from: <https://extranet.infarmed.pt/INFOMED-fo/index.xhtml>
6. DGS S. PNVACINAÇÃO-2020.pdf. 2020;
7. Wenbin Tuo DZ. QS-21: A Potent Vaccine Adjuvant. *Nat Prod Chem Res*. 2015;03(04):3–4.
8. Khan AA, Stocker BL, Timmer MSM. Trehalose glycolipids - Synthesis and biological activities. *Carbohydr Res*. 2012;356:25–36.
9. Seppic. MONTANIDE™ ISA for W/O emulsions - Application [Internet]. Available from: <https://www.seppic.com/en/montanide-isa-w-o>
10. CDC. What is influenza? [Internet]. 2019. Available from: <https://www.seqirus.com/expertise/influenza>
11. Polina Miklush. Seqirus Presents New Clinical Data that Reinforce the Ability of MF59® Adjuvanted Seasonal and Pandemic Influenza Vaccines to Increase Immune Response [Internet]. 2019. Available from: <https://www.seqirus.com/news/seqirus-presents-new-clinical-data-reinforcing-mf59>
12. Domnich A, Arata L, Amicizia D, Puig-Barberà J, Gasparini R, Panatto D. Effectiveness of MF59-adjuvanted seasonal influenza vaccine in the elderly: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine* [Internet]. 2017;35(4):513–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.12.011>
13. Morelli MP, Del Medico Zajac MP, Pellegrini JM, Amiano NO, Tateosian NL, Calamante G, et al. IL-12 DNA Displays Efficient Adjuvant Effects Improving Immunogenicity of Ag85A in DNA Prime/MVA Boost Immunizations. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10(September):1–11.
14. Sivakumar SM, Safhi MM, Kannadasan M, Sukumaran N. Vaccine adjuvants - Current

- status and prospects on controlled release adjuvancity. Saudi Pharm J [Internet]. 2011;19(4):197–206. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.06.003>
15. Anders HJ, Vielhauer V, Eis V, Linde Y, Kretzler M, Perez de Lema G, et al. Activation of toll-like receptor-9 induces progression of renal disease in MRL-Fas(lpr) mice. FASEB J. 2004;18(3):534–6.
 16. Krishnamachari Y, Salem AK. Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. Adv Drug Deliv Rev [Internet]. 2009;61(3):205–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2008.12.013>
 17. Zhou X, Wang YY, Yun Y, Xia Z, Lu H, Luo J, et al. EPAR_HEPLISAV. Andrologia [Internet]. 2015;29(2):1–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jri.2013.05.004>
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0145766>
<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0092623X.2013.864368>
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2014.10.006>
<http://www.sciencedirect.com/science/ar>
 18. Reed SG, Hsu FC, Carter D, Orr MT. The science of vaccine adjuvants: Advances in TLR4 ligand adjuvants. Curr Opin Immunol [Internet]. 2016;41:85–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coi.2016.06.007>
 19. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. Int Immunol. 2005;17(1):1–14.
 20. Plácido GM, Guerreiro MP. Administração de vacinas e medicamentos injetáveis por farmacêuticos. Uma abordagem prática [Internet]. Ordem dos Farmacêuticos. 2015. 260 p. Available from: http://www.ordemfarmaceuticos.pt/xFiles/scContentDeployer_pt/docs/articleFile1842.pdf
 21. EMA. EPAR_Fendrix. 2010;1–29. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/pt_PT/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000829/WC500041059.pdf