

Efecto potenciador de la respuesta inmune contra el Factor de Crecimiento Epidérmico mediante el empleo de liposomas como adyuvante

✉ Yohanka Martínez Gzegozewska, María del Carmen Luzardo Lorenzo, Lesly Calderón Domínguez, Isabel Fabiola Pazos Santos, Carlos Álvarez Valcárcel, María Eugenia Alonso Biosca, María Eliana Lanio Ruiz.

Laboratorio de Biomembranas. Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 #455 e/ J e I, Plaza de la Revolución, Ciudad de la Habana. CP 10400, Cuba. Telf.: (53-7) 324830; Fax: (53-7) 321321; E-mail: yohanka@fbio.uh.cu

RESUMEN

Se estudió la posibilidad de potenciar la respuesta inmune contra el factor de crecimiento epidérmico mediante el empleo de liposomas como adyuvante. Con este objetivo se determinó como influye la composición fosfolipídica de los liposomas que se obtienen mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación, sobre la eficiencia de encapsulación del factor de crecimiento epidérmico y la estabilidad de las vesículas. Los liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina:colesterol inmovilizaron un 35% del total de esta proteína y fueron estables en las condiciones de almacenamiento, también produjeron títulos de anticuerpos anti-factor de crecimiento epidérmico en ratones Balb/c superiores a 1:1000 a los 56 días después de la primera inmunización. Por otra parte, en una población abierta de ratones inmunizados con factor de crecimiento epidérmico conjugado a la proteína portadora P64k y encapsulado en liposomas compuestos por fosfolípidos saturados se observó una respuesta de anticuerpos superior a la de aquellos que recibieron el antígeno adyuvado en alúmina o encapsulado en vesículas de fosfolípidos insaturados. La capacidad del suero para bloquear el reconocimiento del sistema factor de crecimiento epidérmico/receptor de membrana del factor de crecimiento epidérmico, así como las concentraciones de IgG₁, IgG_{2a}, e IgG_{2b} fueron más altas cuando los liposomas estuvieron compuestos por fosfolípidos saturados. La supervivencia de los animales inmunizados con dipalmitoilfosfatidilcolina:colesterol/factor de crecimiento epidérmico, montanide/factor de crecimiento epidérmico, respectivamente y transplantados con células de tumor ascítico de Ehrlich fue superior a la de los animales que fueron inmunizados con alúmina/factor de crecimiento epidérmico. La respuesta de hipersensibilidad retardada que se produjo en los animales inmunizados con liposomas de dipalmitoilfosfatidilcolina:colesterol/factor de crecimiento epidérmico demostró que las vesículas liposomales indujeron inmunidad celular específica para este antígeno.

Palabras claves: liposomas, factor de crecimiento epidérmico, adyuvante, respuesta inmune

Biotechnología Aplicada 2003;20:95-101

ABSTRACT

Enhancing effect on the recombinant Epidermal Growth Factor immune response using liposomes as adjuvant. The use of liposomes as adjuvant in order to potentiate the immune response against epidermal growth factor (EGF) was studied. Firstly, the attention was focused on the influence of phospholipid composition of dehydration-rehydration vesicles (DRV) on the EGF encapsulation efficiency and its release from liposomes. The highest encapsulation efficiency was achieved using DPPC:CI liposomes (35%) which also rendered the lowest EGF release during one month storage and elicited anti-EGF antibody titers in Balb/c mice higher than 1:1000 at 56th day after first immunization. A higher antibody response was observed in NMRI mice immunized with EGF conjugated to P64k protein and immobilized into DRVs composed of saturated phospholipids when compared with the groups immunized with the antigen adsorbed in alum or encapsulated into vesicles of unsaturated phospholipids. Sera obtained from animals treated with saturated phospholipids showed the highest capacity to inhibit EGF/EGF-receptor binding and contained the highest levels of IgG₁, IgG_{2a}, and IgG_{2b} antibody subclass. Animals immunized with EGF immobilized into DPPC:CI liposomes or using montanide as adjuvant and transplanted with Ehrlich ascites tumor cells exhibited better survival than those immunized with EGF adsorbed in alum. Finally, immunization of mice with EGF encapsulated into DPPC:CI liposomes induced cell mediated immunity as shown by delayed type hypersensitivity experiments.

Keywords: liposomes, epidermal growth factor, adjuvant, immune response

Introducción

Numerosos trabajos han descrito la presencia y sobreexpresión del receptor de membrana del factor de crecimiento epidérmico (R-EGF) en tumores humanos de origen epidermoide [1-4] así como la relación de este hecho con la malignidad de estos tumores [5, 6]. Por esta razón, el sistema factor de crecimiento epidérmico/receptor de membrana del factor de crecimiento epidérmico (EGF/R-EGF) ha constituido el

blanco para varias alternativas terapéuticas y la inmunización activa ha sido una de ellas.

En este sentido, se ha logrado generar anticuerpos anti-EGF mediante inmunización con EGF autólogo unido a un portador proteico o con EGF heterólogo en un adyuvante adecuado, en ambos casos se consiguió el bloqueo de la activación del receptor y la inhibición de la progresión del tumor [7, 8]. El empleo de la

1. Rush V, Baselga J, Cordon-Cardo C, Orazem J, Zaman M, Hoda S, *et al.* Differential expression of the epidermal growth factor receptor and its ligands in primary non-small cell lung cancers and adjacent benign lung. *Cancer Res* 1993; 53:2379-85

✉ Autor de correspondencia

proteína P64k, conjugada químicamente al EGF o como proteína de fusión, permitió que el porcentaje de animales respondedores en una población abierta de ratones (NMRI) se elevara a un 90-100%, y se observó una asociación entre el título de anticuerpos y la sobrevida de los animales transplantados con células de tumor ascítico de Ehrlich (TAE) [7, 8].

Las vesículas liposomales pudieran constituir un adyuvante alternativo para la presentación al sistema inmune de un antígeno como el EGF y potenciar, cuantitativa y cualitativamente, la respuesta inmune con relación a la que se obtiene con el empleo de adyuvantes convencionales. El hecho de ser biocompatibles, biodegradables y no tóxicos, posibilitar la encapsulación de otros adyuvantes, así como su potencialidad para producir altos títulos de anticuerpos e inducir inmunidad celular convierte a los liposomas en atractivos candidatos para ser empleados en formulaciones vacunales [9-11].

En el presente trabajo se caracterizan preparaciones liposomales obtenidas mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación (DRVs) con factor de crecimiento epidérmico (EGF) encapsulado como antígeno modelo en cuanto a la eficiencia de encapsulación y la estabilidad de las mismas. Se evaluó, también, la respuesta de anticuerpos anti-EGF en ratones inmunizados con estas preparaciones. Se estudió el índice de sobrevida de los animales inmunizados con EGF en liposomas y en otros adyuvantes y retados con células de TAE. Se evaluó la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones que recibieron el antígeno encapsulado en liposomas o adsorbido en los adyuvantes alúmina y montanide, como una evidencia de la inducción de respuesta inmune celular contra el EGF.

Materiales y métodos

Inmunógenos

El EGF y la proteína P64k recombinantes se obtuvieron en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Para la conjugación del EGF y la P64k se mezclaron ambas proteínas en una relación molar 10:1, y se adicionó glutaraldehído a una concentración final de 0,05% [8]. La mezcla se incubó durante 1 h a temperatura ambiente y se dializó contra tampón fosfato salino (PBS) toda la noche.

Lípidos y adyuvantes

La diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), la fosfatidilcolina de huevo (ePC) y la fosfatidilcolina de soya (sPC) fueron adquiridas de Avanti Polar Lipids (EE.UU.), y de Sigma (EE.UU.) la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) y el colesterol (Cl). La alúmina (gel de hidróxido de aluminio) y el montanide se obtuvieron de Superfos Biosector (Dinamarca) y Seppic (Francia), respectivamente.

Obtención de liposomas DRVs con Factor de Crecimiento Epidérmico encapsulado

Se prepararon vesículas mediante la tecnología de deshidratación-rehidratación de DPPC:Cl, DSPC:Cl, ePC:Cl y sPC:Cl en una relación molar fosfolípido: colesterol 1:1 en todos los casos. Para su obtención se prepararon soluciones clorofórmicas de estos lípidos

y se evaporaron en un rotoevaporador al vacío. La película lipídica resultante se mantuvo a vacío durante 30 min adicionales para garantizar una máxima evaporación del solvente. Las vesículas grandes multilaminares obtenidas mediante la hidratación de esta película se sometieron a ciclos de ultrasonido hasta lograr la opalescencia de la suspensión. A las vesículas pequeñas unilaminares (SUV) se les adicionó la solución de EGF en una relación fosfolípido:EGF de 32 μ moles: 0,05 μ moles y se deshidrataron mediante liofilización durante 24 h.

La rehidratación se llevó a cabo en condiciones controladas con agua bidestilada, agitación y posterior incubación durante 30 min a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase (T_m) de cada uno de los fosfolípidos empleados: temperatura ambiente para ePC y sPC, 45 °C para DPPC y 56 °C para DSPC. Por último, los DRVs fueron centrifugados dos veces a 12000xg durante 30 min con PBS para eliminar el EGF no encapsulado y finalmente resuspendidos en igual tampón para su caracterización o para su utilización en los esquemas de inmunización.

Evaluación de la eficiencia de encapsulación y estabilidad de liposomas DRV que contienen EGF

Para el estudio de la influencia de la composición fosfolipídica sobre la eficiencia de encapsulación del EGF se añadió a las preparaciones de SUV 60000 cpm de EGF marcado con 125 I (125 I-EGF) según el procedimiento de Hunter y Greenwood [12] y EGF sin marcar para garantizar la relación fosfolípido:EGF de 32 μ moles:0,05 μ moles. Los pasos posteriores para la obtención de los DRV se realizaron tal y como se describieron en el epígrafe anterior.

La radioactividad total de los preparados y la radioactividad de los sobrenadantes y precipitados (DRVs) obtenidos después de centrifugar fueron medidas en un contador Gamma 2001 WILJ para la estimación del porcentaje de encapsulación. Estas preparaciones de liposomas, libres de EGF no encapsulado y resuspendidas en PBS, fueron conservadas a 4 °C y en los días 7, 14, 21 y 28 se midió la radioactividad del precipitado y del sobrenadante con el propósito de determinar el porcentaje de EGF liberado como indicador de la integridad de las vesículas durante el almacenamiento.

Algoritmos de inmunización

Ratones Balb/c de 8 semanas de nacidos fueron inmunizados con 5 μ g de EGF encapsulado en DRVs de DPPC:Cl, ePC:Cl o sPC:Cl mediante inyección intraperitoneal (ip) en los días 0 y 28 y se extrajo la sangre para la determinación de las concentraciones de anticuerpos en el suero a los 28, 38 y 56 días después de la primera dosis. Igual esquema de inmunización se siguió en los grupos de ratones NMRI inmunizados intramuscularmente con 10 μ g de EGF enlazado químicamente a la proteína P64k (EGF-P64k) encapsulado en liposomas DRVs de DPPC:Cl, DSPC:Cl y sPC:Cl y/o adsorbido en alúmina, este último como grupo de referencia o control. Las extracciones de sangre para la determinación del título de anticuerpos se realizaron los días 14, 40, 56 y 91 después de la primera inmunización y se considera-

2. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaoli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 1993; 11:1873-78

3. Jaminis J, Nakopoulou L, Panagos G, Davaria P. Immunohistochemical expression of EGF-R in malignant surface epithelial ovarian neoplasms (SEON). *Eur J Gynaecol Oncol* 1994;15:19-23

4. Klijn JG, Look MP, Portengen H, Alexieva-Figuch J, van-Putten WL, Foekens JA. The prognosis value of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in primary breast cancer. Results of ten years follow-up study. *Breast Cancer Res Treat* 1994;29:73-83

5. Ichihachi Y, Tateishi M, Toda T, Minamizono Y, Nagasaki S. Epidermal Growth Factor in gastric carcinoma as a risk factor of postoperative recurrence. *Int Surg* 1993; 78:196-9

6. Iida A, Hirose K, Arai M, Yamaguchi A, Nakagawara G. Relationships among the expression of the epidermal growth factor receptor, proliferating cell nuclear antigen labeling index, and lymph node metastasis in gastric cancer. *Oncology* 1995; 52:189-95

7. González G, Sánchez B, Suárez E, Beausoleil I, Pérez O, Lastre M, et al. Induction of immune recognition of self Epidermal Growth Factor (EGF): Effect on EGF-biodistribution and tumor growth. *Vaccine Res* 1996; 5: 233-44

8. González G, Pardo OL, Sánchez B, García JL, Beausoleil I, Marinello P, et al. Induction of immune recognition of self Epidermal Growth Factor II: Characterization of the antibody response and the use of a fusion protein. *Vaccine Res* 1997; 6: 91-100

9. Lasic DD. Liposomes as Immunoadjuvants. In: Lasic DD, editor. *Liposomes: from physics to applications*. Elsevier, Amsterdam; 1993 p. 347-471

10. Kunisawa J, Nakagawa S, Mayumi T. Pharmacotherapy by intracellular delivery of drugs using fusogenic liposomes: application to vaccine development. *Adv Drug Deliv* 2001; 42(3):177-86

11. Sihorkar V, Vijas SP. Potential of polysaccharide anchored liposomes in drug delivery, targeting and immunization. *J Pharm Sci* 2001; 42(2):138-58

12. Hunter WM, Greenwood F. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962; 191:495-8

ron positivos aquellos títulos iguales o superiores a 1:1000.

Para estudiar el efecto de la inmunización con EGF en diferentes adyuvantes (montanide, alúmina y DRV de DPPC:Cl) sobre la sobrevida después del trasplante del tumor, se inmunizaron ratones Balb/c ip con 5 µg de EGF en el caso de liposomas y 50 µg para el resto de los adyuvantes en los días 0, 7, 14 y 21 y se retaron con el tumor el día 24.

El estudio comparativo del efecto de los diferentes adyuvantes sobre la respuesta DTH se realizó según el esquema de 4 dosis descrito en el párrafo anterior.

Medición del título de anticuerpos

Los niveles de anticuerpos anti-EGF fueron determinados mediante la técnica de ELISA. Las placas de microtitulación fueron recubiertas con 10 µg/mL de EGF en tampón de recubrimiento ($\text{CO}_3\text{Na}/\text{CO}_3\text{HNa}$ 1M, pH 9,6) durante toda la noche a 4 °C. El bloqueo se llevó a cabo con 60 µL/pozo de albúmina de suero bovino (BSA) al 1% en PBS/Tween 0,05% (PBS/Tween/BSA) durante 1 h a 37 °C. Después de los lavados se realizaron diluciones seriadas de los sueros en PBS/Tween/BSA y se incubaron las placas durante 1 hora a 37 °C. Las placas fueron lavadas con PBS/Tween luego de la incubación y adicionados 50 µL/pozo de anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa en PBS/Tween/BSA e incubadas 1 h a 37 °C. Después de lavar extensivamente con el mismo tampón, los anticuerpos anti-EGF presentes en el suero fueron detectados mediante la adición de peróxido de hidrógeno en presencia de *ortofenilendiamina* en tampón fosfato-citrato pH 5. La absorbancia fue medida a 492 nm en un lector de placas de ELISA Multiskan EX.

Determinación de las subclases de IgG

Las subclases de IgG fueron determinadas mediante ELISA. Las placas de microtitulación fueron recubiertas y bloqueadas como se describió anteriormente. Después de la incubación con las diferentes diluciones del suero de los animales y de los lavados se adicionaron 50 µL/pozo de conjugado anti-subclase de IgG-biotina en PBS/Tween/BSA y se incubó la placa durante 1 h a 37 °C. Luego de los lavados se adicionaron 50 µL/pozo del conjugado estreptavidina-peroxidasa y se incubó 1 h a 37 °C. Las placas fueron lavadas y detectados los anticuerpos presentes en el suero mediante la adición de peróxido de hidrógeno en presencia de *ortofenilendiamina* en tampón fosfato-citrato pH 5.

Ensayo de inhibición de la unión del EGF/R-EGF por el suero de los ratones inmunizados

Para la realización de este ensayo se utilizó como fuente de receptores una suspensión de membrana de placenta humana. Para su obtención, se homogeneizaron 100 g de tejido con un homogeneizador de cuchillas (Waring Blender) en tampón Tris-HCl 10 mM, pH 7,4 y se centrifugaron a 4000xg durante 10 min. Al sobrenadante se le adicionó MgCl_2 para dar una concentración final igual a 10mM y se incubó durante 1 h. Luego se centrifugó 30 min a 4000xg y la fracción de membrana (precipitados) se conservó a -20 °C. Todas las operaciones se realizaron a 4 °C.

A una suspensión de membrana así obtenida y conteniendo 400 µg de proteína determinados por el

método de Lowry [13] le fueron adicionados 1×10^5 cpm de ^{125}I -EGF. Luego de incubar 1 h a temperatura ambiente en presencia de diluciones 1:5 y 1:10 del suero de los ratones inmunizados o dilución 1:5 del suero de ratones no inmunizados (suero control), la reacción se detuvo por adición de 1 µL de PBS y se centrifugó a 12000xg durante 15 minutos para la determinación de la radiactividad del sedimento. Se consideró como control positivo la inhibición de la unión provocada por un exceso de EGF no radiactivo (1 mg/mL) [14].

Medida de la sobrevida en los ratones inmunizados y transplantados con células de Tumor Ascítico de Erhlich

Para el estudio comparativo de la sobrevida se emplearon ratones Balb/c inmunizados con EGF en diferentes adyuvantes según el esquema de cuatro dosis ya descrito. Los grupos controles recibieron el adyuvante correspondiente en ausencia del antígeno. Tres días después de la última inmunización los animales fueron retados con 2×10^5 células de TAE. El tiempo de observación fue 40 días. El cálculo de los tiempos de sobrevida y la curva de sobrevida se realizaron según Kaplan-Meier con el paquete estadístico SPSS, versión 10.05/1999. Como medida de la sobrevida se determinó el indicador "incremento de la extensión de vida" (ILS) el cual fue calculado como la relación del tiempo de sobrevida de los animales inmunizados (X_i) entre el tiempo de sobrevida de los animales controles (X_c) según la expresión:

$$\text{ILS} = [(X_i - X_c) / X_c] \times 100$$

Respuesta de Hipersensibilidad Retardada en ratones inmunizados con EGF

La respuesta inflamatoria de tipo DTH se evaluó en ratones Balb/c inmunizados con EGF adsorbido en los adyuvantes montanide y alúmina o encapsulado en liposomas DRV de DPPC:Cl, con el esquema de inmunización de cuatro dosis previamente descrito. A los 24 días de concluida la inmunización, los animales fueron retados en el cojinete de la pata, con 2,5 µg de EGF en alúmina. Se consideraron controles aquellos animales tratados sólo con alúmina durante la inmunización. La inflamación de la pata se midió con un pletismómetro (Ugo Basile, Comerio, Italia) a las 6, 24 y 48 h después del reto con el antígeno.

Análisis estadístico

Se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov y a continuación la prueba de Bartlett. Se realizaron análisis de varianzas de clasificación simple o bifactorial, con el modelo de efectos fijos. Para comparar las medias entre sí se empleó la prueba de rangos múltiples de Duncan. A los datos que no cumplieran una distribución normal se les realizó la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación de suma de rangos de Student-Newman-Keuls [15].

En el ensayo de sobrevida de los ratones inmunizados y transplantados con TAE, la comparación de los tiempos de sobrevida entre los diferentes tratamientos se realizó según la prueba de log-rank con el paquete estadístico SPSS, versión 10.05/1999.

Todas las pruebas se realizaron con un nivel de significación menor que 0,05 ($p < 0,05$).

13. Lowry DH, Rosebrough NJ, Farr AL, Jandall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 191:165-75

14. Macías A, Pérez R, Lage A. Estudios sobre el Factor de Crecimiento Epidérmico II. Desarrollo de un radioreceptor análisis para la determinación de cantidades picomolares. *Imn y Biotec* 1986; 2:115-27

15. Sigarra A. Biometría y Diseño Experimental. La Habana: Pueblo y Educación; 1985

Resultados

Los porcentajes de encapsulación del EGF para las diferentes composiciones fosfolipídicas resultaron estadísticamente equivalentes; 35% DPPC:Cl, 29% ePC:Cl y 31% sPC:Cl (Figura 1) y superiores a los obtenidos mediante la tecnología de congelación-descongelación que rinde FATMLVs (ePC:Cl y DPPC:Cl, entre 6-7%, [16]). Cuando se evaluó el efecto de la composición de la preparación liposomal sobre la liberación del EGF luego de siete días de almacenamiento se observó una liberación del 11% y el 9% en aquellos liposomas constituidos por sPC y ePC respectivamente y mayor con relación a los liposomas de DPPC que liberaron el 5% (Figura 2). Si bien se observó un incremento en la fuga del contenido de las vesículas a

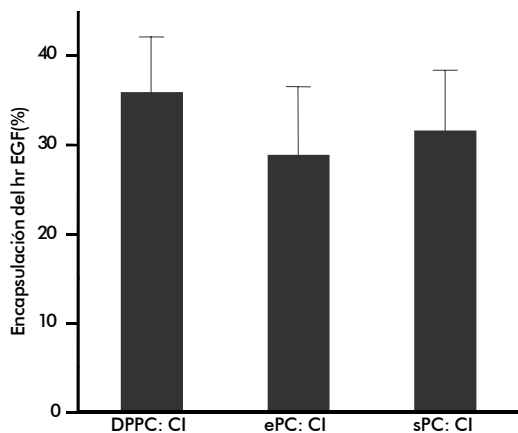


Figura 1. Eficiencia de encapsulación del EGF en DRV's de diferente composición fosfolipídica. Los liposomas fueron preparados a una relación molar fosfolípido:colesterol de 1:1 y se adicionaron 0,05 μ moles de EGF por cada 32 μ moles de lípidos totales. Cada barra representa la media de seis determinaciones con su correspondiente desviación estándar. No se encontraron diferencias significativas entre las vesículas de diferentes composiciones fosfolipídicas de acuerdo a un ANOVA de clasificación simple.

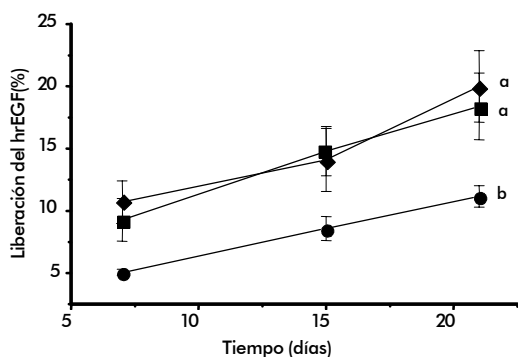


Figura 2. Estabilidad de los liposomas DRV's de diferentes composiciones lipídicas con EGF encapsulado (sPC:Cl, ePC:Cl, DPPC:Cl). Las suspensiones de vesículas que contenían 125 I-EGF fueron almacenadas a 4°C y centrifugadas semanalmente para la evaluación de la radiactividad asociada a ellas y liberada al sobrenadante. Cada punto representa la media de tres determinaciones con su desviación estándar. Las letras diferentes junto a las curvas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para una $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de Duncan.

los 14 y 21 días, la mayor liberación tiene lugar en los primeros siete días de almacenamiento en las condiciones descritas. Resultaron menos estables al final del experimento aquellas constituidas por sPC y ePC, que liberaron el 18 y 15% de su contenido, con respecto a las de DPPC que liberaron sólo el 11%.

La inmunización con EGF encapsulado en liposomas DRV de DPPC:Cl y ePC:Cl produjo una respuesta de anticuerpos en ratones Balb/c, mientras que la inmunización con las preparaciones de sPC:Cl no indujo respuesta (Figura 3). A los 28 días de administrada la primera dosis se observaron títulos significativos en el 14% de los animales inmunizados con EGF encapsulado en DRV de DPPC:Cl. La proporción de animales respondedores se incrementó a los 38 días hasta alcanzar un 86%. Solo un 14% de los animales inmunizados con las preparaciones liposomales de ePC:Cl respondieron a los 38 días. El 100% de los animales inmunizados con EGF inmovilizado en liposomas de DPPC:Cl alcanzaron títulos mayores que 1:1000 a los 56 días, mientras que el 57% de aquellos inmunizados con EGF inmovilizado en liposomas de ePC:Cl fueron respondedores a ese mismo tiempo.

Para la comparación de la respuesta inmune anti-EGF en la cepa abierta de ratones NMRI se llevó a cabo una conjugación química entre el EGF y la proteína P64k antes de su inmovilización en liposomas (DRV) de DPPC:Cl, sPC:Cl o DSPC:Cl. Previamente, se caracterizó la eficiencia de encapsulación de estas vesículas para la variante EGF-P64k (25% DPPC:Cl, 20% sPC:Cl y DSPC:Cl) y la dosis administrada a los animales fue ajustada según este dato.

El empleo de los liposomas DRV's de diferente composición fosfolipídica que contenían la variante conjugada EGF-P64k en la inmunización de estos animales con un esquema de doble dosis, produjo respuesta de anticuerpos con títulos iguales o mayores que 1:1000 en el 100% de los animales después de la segunda inmunización, títulos que fueron superiores para aquellos grupos que recibieron el antígeno encapsulado en liposomas de DSPC:Cl (40 y 56 días) y DPPC:Cl (40

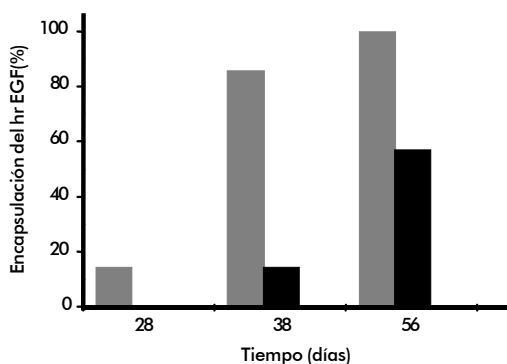


Figura 3. Respuesta de anticuerpos IgG anti-EGF inmovilizado en DRV's de diferente composición fosfolipídica (DPPC:Cl en gris, ePC:Cl en negro). Los ratones Balb/c fueron inmunizados con 5 μ g de EGF en liposomas constituidos por diferentes fosfatidilcolinas y colesterol en una relación molar 1:1 y con un esquema de inmunización de doble dosis con intervalo de 28 días entre dosis. La ordenada representa el porcentaje de animales con título de anticuerpos a una dilución de suero igual o mayor que 1:1000. Cada composición lipídica fue evaluada en grupos de 7 animales.

16 Luzardo MC, Martínez Y, Calderón L, Álvarez C, Alonso ME, Disalvo A, et al. Características de la encapsulación de EGF, P64K y el conjugado de ambas proteínas en liposomas FATMLV. *Biotechnología Aplicada* 2002; 19:147-52

días) con respecto a los inmunizados con los DRV de sPC:Cl o alúmina como adyuvantes (Figura 4).

El análisis de las subclases de IgG de los anticuerpos anti-EGF inducidos demostró una mayor eficiencia para potenciar cualitativamente la respuesta inmune de las preparaciones liposomales constituidas por fosfolípidos saturados (DPPC y DSPC), por cuanto estos grupos exhibieron no sólo concentraciones superiores de IgG₁ sino también de IgG_{2a} e IgG_{2b}, en relación a las vesículas de fosfolípidos insaturados (sPC) o la propia alúmina utilizada como grupo de referencia (Figura 5). Los sueros de estos animales provocaron la inhibición de la unión del EGF radioiodado a su receptor en membrana de placenta humana, y esta inhibición fue mayor cuando los sueros procedían de ratones inmunizados con EGF-P64k en DRV's de DPPC:Cl y DSPC:Cl como adyuvantes (Figura 6).

Los animales inmunizados con EGF encapsulado en liposomas de DPPC:Cl o incluido en los adyuvantes alúmina o montanide fueron retados con células de TAE, un tumor transplantable de origen epitelial con alto contenido de R-EGF (10⁴ sitios/célula) [17]. En todos los casos la supervivencia fue superior a la de los grupos controles tratados sólo con el adyuvante correspondiente. Se obtuvo un ILS de 80% para la inmunización que se realizó con el adyuvante montanide y 50 µg de EGF/dosis, de 87% cuando se utilizaron DRV's de DPPC:Cl y 5 µg de EGF/dosis y 35% para la inmunización que se realizó con 50 µg de EGF/dosis adsorbido en alúmina (Figura 7).

Los valores de inflamación del cojinete de la pata obtenidos en los grupos de animales estudiados son elevados para los tres adyuvantes empleados pasadas 6 h del reto con el antígeno. Estos valores se mantienen altos a las 24 y 48 h para los ratones inmunizados con liposomas/EGF y montanide/EGF, y para los anima-

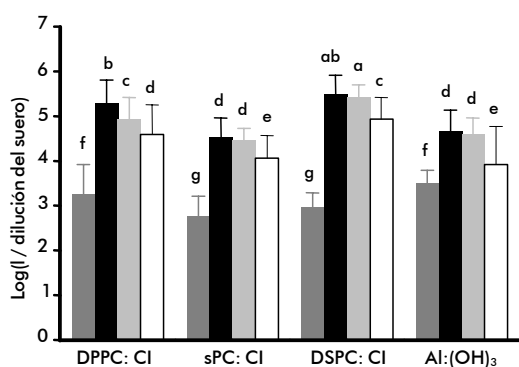


Figura 4. Curso temporal de la respuesta inmune anti-EGF (IgGtotal) en ratones NMRI inmunizados con EGF-P64k encapsulado en liposomas de diferente composición fosfolipídica o adsorbido en Alúmina. Se representan los días después de la primera dosis: 14 días en gris, 40 días en negro, 56 días en gris claro, 91 días en blanco. Los animales ($n = 7$) fueron inmunizados con 10 µg de EGF conjugado a la P64k y con un esquema de inmunización de doble dosis con intervalo de 28 días entre ambas. La ordenada es el logaritmo del inverso de la dilución del suero para la cual la medida de la absorbancia mediante ELISA es mayor que 0,2. Letras diferentes sobre las barras indican diferencias estadísticamente significativas entre cada grupo experimental para una $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de comparación de suma de rangos Student-Newman-Keuls.

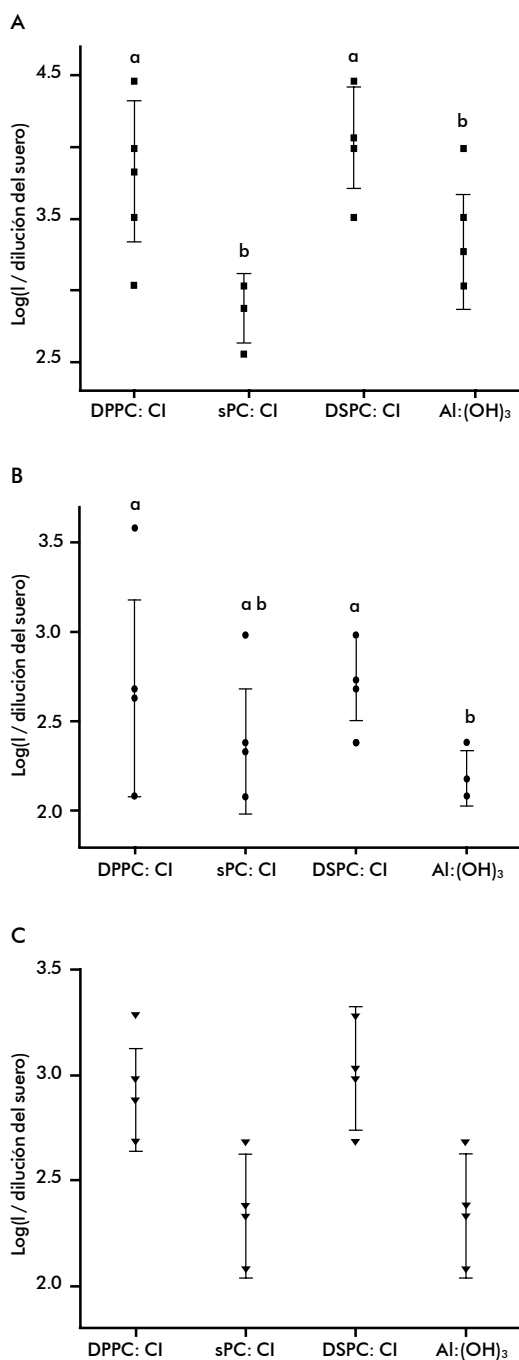


Figura 5. Subclases de IgG inducidas en ratones NMRI inmunizados con EGF-P64k encapsulados en liposomas de diferente composición fosfolipídica o adsorbido en Alúmina (A: IgG₁, B: IgG_{2a}, C: IgG_{2b}). Los animales ($n = 7$) fueron inmunizados con 10 µg de EGF conjugado a P64k y con un esquema de inmunización de doble dosis con intervalo de 28 días entre dosis. Los resultados correspondieron a la extracción de sangre realizada a los 40 días después de la primera inmunización. La ordenada es el logaritmo del inverso de la dilución del suero para la cual la absorbancia evaluada mediante ELISA es mayor que 0,2. Se representa el título individual de cada animal n_i y la media de los títulos con su desviación estándar para cada tratamiento. Las letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para una $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de Duncan.

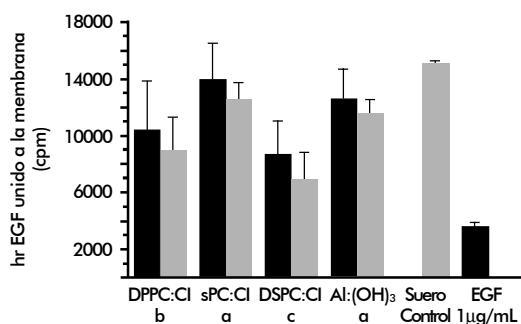


Figura 6. Inhibición de la unión del ^{125}I -EGF por el suero de los animales inmunizados. La unión del EGF radioiodado a los receptores de EGF en membranas de placenta humana fue medida en presencia de diluciones 1:10 (negro) y 1:5 (gris) del suero de los ratones NMRI inmunizados con EGF-P64K encapsulado en liposomas de diferente composición fosfolipídica o adsorbido en alúmina y de animales no inmunizados (suero control). La ordenada representa la radioactividad del ^{125}I -EGF unido a membrana. Las letras diferentes bajo el eje de las abscisas indican diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos para una $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de Duncan.

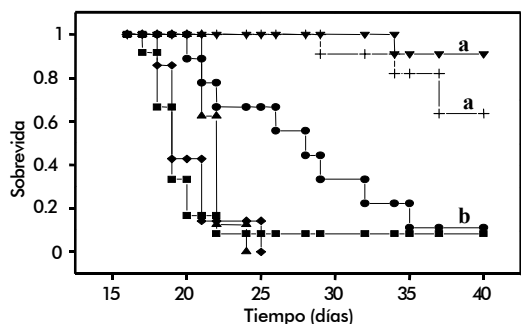


Figura 7. Efecto de la inmunización con EGF en diferentes adyuvantes sobre la supervivencia de los animales retados con células de TAE: DRV de DPPC:Cl; DRV de DPPC:Cl/EGF +; Alúmina; Alúmina/EGF; Montanide; Montanide/EGF. Los ratones Balb/c fueron inmunizados semanalmente durante 1 mes con 50 µg de EGF cuando los adyuvantes empleados fueron alúmina o montanide y 5 µg cuando se emplearon los liposomas. Los grupos control fueron tratados sólo con el adyuvante correspondiente. El reto se realizó con 2×10^5 células de TAE, 3 días después de la última inmunización. La ordenada representa la supervivencia acumulada en los días sucesivos al trasplante de tumor. Letras diferentes sobre las curvas de tratamientos indican diferencias estadísticamente significativas entre estos para una $p < 0,05$ de acuerdo con la prueba de log-rank.

les inmunizados con alúmina/EGF hay una disminución desde las 24 h, que retorna al valor inicial a las 48 h sin diferencias con respecto a su control (Figura 8).

Discussion

La castración del EGF por anticuerpos específicos contra esta molécula para impedir su unión al receptor fue concebida como alternativa terapéutica para el tratamiento de aquellos tumores malignos cuyas células sobreexpresan el R-EGF. La posibilidad de inducir la producción de autoanticuerpos bloqueadores de la

interacción ligando-receptor mediante inmunización activa con EGF autólogo enlazado a un portador proteico o con EGF de una especie diferente fue demostrada por González y colaboradores [7, 8].

El estudio de la modulación o modificación de la respuesta inmune anti-EGF como resultado de la capacidad adyuvante de las vesículas liposomales requirió, en una primera etapa, evaluar la eficiencia de encapsulación de los liposomas DRV de diferente composición fosfolipídica con el EGF como soluto a inmovilizar. El empleo de fosfatidilcolina de diferente naturaleza en la preparación de las vesículas no produjo diferencias significativas en los niveles de encapsulación del EGF en estas vesículas (Figura 1). Sin embargo, el comportamiento de estas vesículas durante el almacenamiento en suspensión y a 4 °C fue diferente (Figura 2); las vesículas que contenían sPC y ePC, con temperaturas de transición de fase menores que 0 °C ($T_m = -25$ °C y -15 °C $< T_m < -5$ °C, respectivamente) [18], exhibieron una mayor liberación de su contenido que las vesículas que contenían DPPC ($T_m = 41$ °C) [18]. Probablemente, las bicapas de las vesículas de sPC y ePC, aún en presencia de colesterol, se encuentran en un estado menos estructurado a la temperatura de almacenamiento, de manera que pudiera favorecerse la interacción proteína-membrana y el flujo libre de la molécula de EGF a través de la bicapa lipídica como resultado de su desestabilización.

Resultados previos obtenidos por nuestro grupo de trabajo han sugerido una posible interacción EGF-bicapa lipídica. La modificación de la variación de la entalpía de la transición de fase de vesículas de DPPC y DSPC en presencia de EGF ha sido uno de los hechos que confirma esta idea. Esta modificación resultó menos acentuada en las vesículas de DPPC (datos no publicados) en correspondencia con una menor liberación de su contenido durante el almacenamiento. La inmunización de ratones Balb/c con EGF inmovilizado en liposomas constituidos por DPPC:Cl permitió obtener títulos de anticuerpos anti-EGF más elevados que los observados con EGF en liposomas compuestos por ePC o sPC (Figura 3). Este resultado pudiera estar relacionado con la menor estabilidad que presentan estas últimas partículas en suspensión durante el almacenamiento (Figura 2), lo que es indicativo de una menor capacidad de retención del soluto cuando las bicapas lipídicas poseen bajas T_m [19]. Por otra parte, estas vesículas constituyen un mejor blanco para la acción desestabilizadora de las lipoproteínas plasmáticas, especialmente de las lipoproteínas de alta densidad, por la sustracción más eficiente de las moléculas fosfolipídicas de las membranas liposomales [20]. Una más rápida desintegración de las vesículas, una vez puestas en contacto con el medio biológico, pudiera impedir que estas ejerzan su acción adyuvante. Las vesículas constituidas por DPPC cuya T_m es elevada y, por tanto, la membrana más empaquetada, conservan su integridad por periodos de tiempo más largos lo que las convierte en verdaderos depósitos de antígeno aún cuando se trate de un polipéptido como el EGF capaz de interactuar con la bicapa lipídica y potenciar la liberación de su contenido.

La conjugación química entre el EGF y P64k resultó un paso obligado para la obtención de una respuesta de anticuerpos en una población de ratones abierta

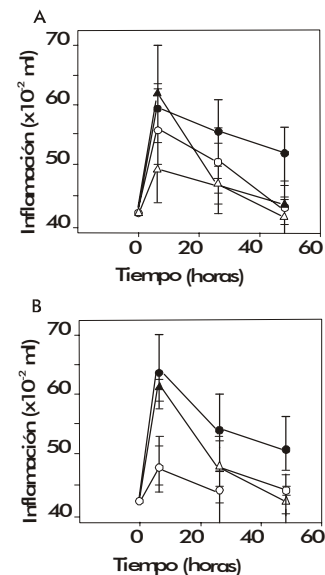


Figura 8. Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en ratones Balb/c inmunizados con EGF en diferentes adyuvantes. Se compara la DTH de:

A: Montanide-Montanide/EGF (-) con Alúmina-Alúmina/EGF (-)
B: Liposomas-Liposomas/EGF (-) con Alúmina-Alúmina/EGF (-)
Los animales fueron inmunizados semanalmente durante 1 mes con 50 µg de EGF contenido en alúmina o montanide o 5 µg de EGF encapsulado en DRV de DPPC:Cl. Los grupos control fueron tratados sólo con el adyuvante. La DTH se provocó con la inyección de 2,5 µg de EGF en alúmina en el cojín de la pata de los animales previamente sensibilizados. Los valores de inflamación se refieren de manera relativa respecto a la medida del cojín antes del reto con el antígeno.

17. Lombardero J, Pérez R, Lage A. Epidermal Growth Factor inhibits thymidine incorporation in Ehrlich ascites tumor cells *in vivo*. *Neoplasma* 1986; 33:423-9

18. Marsh D, Phil MAD. Handbook of Lipid Bilayers. CRC Press, Boca Raton; 1990 p. 80-85

19. Gregoriadis G. Fate of injected liposomes: observations on entrapped solute retention, vesicle clearance and tissue distribution *in vivo*. IN: Gregoriadis G. editor. Liposomes as drug carriers: recent trends and progress. J.Wiley, London; 1998. p.1-15

20. Senior J, Gregoriadis G. Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components. *Life Sciences* 1982; 30:2123-36

como NMRI. González y colaboradores [7, 8] lograron incrementar, en esta cepa de ratones, la proporción de respondedores de un 10 a un 90-100% con el empleo del conjugado EGF-P64k, en sustitución del EGF, en adyuvante completo de Freud. La respuesta inmune en estos animales es más heterogénea que en la cepa isogénica Balb/c. Probablemente, el 30% de la secuencia de aminoácidos de EGF humano que no es homólogo con el EGF murino es insuficiente para aportar epítomos T en una población de ratones con elevado polimorfismo de sus moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) como NMRI [8]. La similitud de la respuesta para los tres fosfolípidos empleados en la preparación de las vesículas pudiera deberse al carácter altamente inmunogénico de la proteína P64k [21, 22], cuya presencia en el conjugado químico permitió obtener títulos de anticuerpos anti-EGF significativos aún cuando se inmovilizó en liposomas de menor estructuración de su bicapa, como lo son aquellos constituidos por sPC:Cl (Figura 4). La producción de anticuerpos anti-EGF con una mayor capacidad de bloquear el reconocimiento del EGF por su receptor en los animales inmunizados con el antígeno encapsulado en las preparaciones liposomales constituidas por los fosfolípidos saturados (Figura 6), así como la inducción de niveles significativos de los isotipos IgG_{2a} e IgG_{2b}, junto con IgG₁ (Figura 5), indicativo de la existencia de un patrón de respuesta mixto Th₁/Th₂, confirmó que estas vesículas son capaces de adyuvan y modular más eficientemente la respuesta inmune anti-EGF que aquellas constituidas por fosfolípidos insaturados o la alúmina. Este resultado pudiera estar relacionado con una mayor resistencia de los fosfolípidos saturados a la hidrólisis en el compartimento endocítico y la posibilidad de ser liberados de éste hacia el citoplasma como complejos lipido-proteína, y así asociados ser procesados a través de las vías clásicas de presentación antigénica MHC I/MHC II [23].

La presencia de anticuerpos anti-EGF en los animales inmunizados produjo un retardo en la progresión del tumor y, por tanto, un incremento significativo de la sobrevida para los tres adyuvantes empleados con respecto a su control. Un incremento en la extensión de vida igual a 87% en los ratones inmunizados con EGF encapsulado en liposomas de DPPC:Cl como adyuvante y retados con células de TAE constituyó un resultado muy alentador si, además, se tiene en cuenta que la dosis de EGF utilizada fue de 5 µg mientras que cuando se inmunizó con el adyuvante montanide (ILS = 80%) se empleó una dosis 10 veces superior (Figura 7). El empleo de la alúmina en la inmunización, aún cuando se utilizaron 50 µg de EGF/dosis, no elevó de manera significativa la sobrevida de los animales (ILS = 35%) si se compara con los

adyuvantes liposomas y montanide. Estos resultados pudieran indicar la generación de una mayor cantidad de anticuerpos anti-EGF con capacidad de neutralizar el EGF en la vecindad del tumor, por tanto, la acción mitogénica del mismo se podría evitar cuando se emplean los liposomas de DPPC:Cl o el montanide como adyuvantes.

Los liposomas han sido utilizados clásicamente para potenciar la inducción de la respuesta inmune humoral, escasos son los trabajos que informan de sus posibilidades como adyuvantes para la inducción de respuesta inmune celular contra antígenos proteicos. En algunos de ellos se ha demostrado la capacidad de las preparaciones liposomales para inducir respuesta de linfocitos T citotóxicos cuando la formulación contiene, además, lípido A [24]. La posibilidad de la inducción de una respuesta inmune mediada por células por las preparaciones liposomales con EGF inmovilizado se evaluó a través del estudio de la respuesta de hipersensibilidad retardada contra el EGF. Se conoce que la reacción de DTH está mediada por subpoblaciones de linfocitos Th₁ circulantes, que se inducen en el primer contacto con el antígeno y que al enfrentarse con él, en un segundo contacto, se activan y liberan citoquinas promotoras de inflamación, a través del reclutamiento y activación de los macrófagos en el sitio de entrada del antígeno [25].

Los valores de inflamación del cojinete de la pata medidos después de la inyección del antígeno en los animales inmunizados con EGF en los diferentes adyuvantes, se mantuvieron altos cuando los adyuvantes empleados fueron los liposomas o el montanide (Figura 8), utilizado este último como control positivo debido a su efecto inductor de respuesta inmune celular [26]. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que tanto los liposomas como el montanide indujeron una respuesta inmune de tipo DTH, ya que la respuesta inflamatoria se prolongó por 48 h.. Como era esperado, la alúmina no fue capaz de sostener la inflamación por tiempo prolongado y mostró un valor de inflamación igual al de su control desde las 24 h. Estos resultados demostraron la inducción de un patrón de citoquinas Th₁, relacionado con la respuesta inmune celular y confirmaron los resultados hallados al estudiar los cambios de isotipo, lo cual responde también a la generación de un patrón de citoquinas Th₁ [25].

Así, la generación de una respuesta inmune de tipo mixto contra el EGF encapsulado en vesículas liposomales, dada por la producción de anticuerpos IgG₁, la generación de los isotipos IgG_{2a} e IgG_{2b} y la respuesta DTH, demostraron las potencialidades adyuvantes de los liposomas frente a la alúmina para este antígeno en particular por lo que podrían constituir una alternativa promisorio para la presentación eficiente de otros antígenos al sistema inmune.

21. Guillén G, Silva R, Alvarez A, Coizeau E, Novoa L, Selman M, et al. Cloning and expression of a high molecular weight protein (PM-6) from the *Neisseria meningitidis* strain B:4:P1.15. Evaluation of the immunogenicity and bactericidal activity of antibodies raised against the recombinant protein. In.: Conde CJ, editor. Pathology and Immunobiology of *Neisseriaceae*. México:INSP; 1994. p. 834-40

22. Silva R, Selman M, Guillén G, Herrera L, Fernández JR, Novoa LI, et al. Inventors. Nucleotide sequence coding for an outer membrane protein from *Neisseria meningitidis* and use of said sequence in vaccine preparations. US patent 5,286,484. 1994.

23. Rao M, Alving CR. Delivery of lipids and liposomal proteins to the cytoplasm and Golgi of antigen-presenting cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2000; 41:171-88

24. Alving CR, Koulchin V, Glenn GM, Rao M. Liposomes as carriers of peptide antigens: induction of antibodies and cytotoxic T lymphocytes to conjugated and unconjugated peptides. *Immunol Rev* 1995; 65:99-113

25. Roitt I, Brostoff J, Male D. Immunology. 6th ed.. Mosby International LTD; 2001 p. 200-260

26. Vogel FR. The role of adjuvants in retroviral vaccines. *Int J Immunopharmac* 1995; 17(2):85-90