



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Estudio del Efecto de Adyuvantes en las Características de los Anticuerpos
Inducidos Contra la Vacuna de Influenza Humana en Ratones

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

JUAN VOUTSSAS LARA

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. EDDA LYDIA SCIUTTO CONDE
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

COMITÉ TUTOR:

DR. RAÚL JOSÉ BOBES RUÍZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

DR. ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad de México, Enero de 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Immunization has been a great public health success story. The lives of millions of children have been saved, millions have the chance of a longer healthier life, a great chance to learn, to play, to read and write, to move around freely without suffering.”

Nelson Mandela
(1918 – 2013)

Este trabajo de tesis doctoral se realizó gracias al financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) a través de la beca 577065. Aunado a este financiamiento se agradece a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (PDCB) y al Instituto de Investigaciones Biomédicas (IIB) por las facilidades otorgadas para la realización mis estudios de doctorado.

Agradecimientos:

El más grande de los agradecimientos a mis padres Evangelina Lara Velázquez y Juan Voutsas Márquez por tantos años de ayuda incondicional, permanente apoyo y su gran amor. Por todos sus consejos y discusiones que hicieron posible llegar a término este trabajo, por el propio trabajo que pusieron en este proyecto de posgrado junto a mi día a día. Su enorme fortaleza y esfuerzo están plasmados en cada hoja de este trabajo y es gracias a los grandes seres humanos y al gran ejemplo que son que me inspira y motiva cada día y que me hacen el profesionalista que soy.

Gracias a la Dra. Edda Sciutto Conde por una oportunidad única de colaborar con ella, aprender de ella y juntos desarrollar este trabajo que esperamos aporte al conocimiento de la humanidad, en el constante crecimiento de la ciencia y en aras de un futuro mejor para todos.

Gracias a mis hermanas Evangelina y Jennifer, a mis tías(os), primas(os) y toda mi gran familia que me apoyó en todo momento para continuar a término este proyecto tan complejo llamado posgrado y que siempre han estado a mi lado dándome fuerzas y aliento aún en los momentos más difíciles.

Un gran agradecimiento a todos mis compañeros de laboratorio que, con su gran trabajo, consejos, conocimiento o inclusive su amistad, impulsaron la investigación que aquí se presenta. Gracias a la Dra. Gladis Fragoso, Dra. Jacquelynne Cervantes, Dra. Marisela Hernández que ayudaron a construir día a día este proyecto con su constante trabajo, al Dr. Ricardo A. Vázquez quien desarrollo la metodología comparativa entre las estructuras tridimensionales de hemaglutinina, a la Dra. Georgina Díaz por tanta ayuda y enseñanzas con el modelo biológico manejado, a la Dra. Patricia de la Torre por su vasta experiencia en secuenciación, al Dr. Gonzalo Acero por todo su conocimiento en las bibliotecas de fagos y tantos compañeros de laboratorio a lo largo de todos estos años. Gracias infinitas por tanta ayuda y por tantos años de trabajo y gran esfuerzo de la más alta calidad y por su vasto conocimiento.

Índice General

1. Resumen.....	6
2. Introducción.....	8
3. Justificación.....	15
4. Hipótesis.....	16
5. Objetivo general.....	17
6. Objetivos específicos.....	17
7. Materiales y métodos.....	18
8. Resultados.....	29
8.1. Título de clases y subclases de Igs medidos por ELISA.....	29
8.2. Capacidad de neutralización del virus de influenza.....	33
8.3. “Biopanning” de biblioteca de péptidos aleatorios.....	34
8.4. Reactividad de clonas aleatorias de biblioteca de fagos seleccionadas contra <i>pooles</i> de sueros de los diferentes grupos vacunados.....	34
8.5. Secuenciación de clonas reactivas.....	38
8.6. Identificación de epítomos/mimotopos por bioinformática.....	41
9. Discusión.....	50
10. Conclusiones.....	62
11. Perspectivas a futuro.....	63
12. Referencias bibliográficas.....	64
13. Anexo.....	70
14. Artículo:.....	72

Índice de figuras

Figura 1. Balance entre complejidad, seguridad e inmunogenicidad.....	9
Figura 2. Desarrollo cronológico de vacunas y su formulación con adyuvantes de 1800 a 2015	10
Figura 3. Diagrama de bacteriófago M13 silvestre	24
Figura 4. Diagrama de flujo de las rondas de selección del procedimiento de “biopanning”	25
Figura 5. Título de clases y subclases de inmunoglobulinas determinador por ELISA.....	30
Figura 6. Gráfica de puntos de título de las diferentes clases/subclases de inmunoglobulinas de la Tabla 1 A	32
Figura 7. Ensayo de microneutralización de virus de influenza A H1N1pdm09 por “pooles” de sueros	33
Figura 8. Título de bacteriófagos por ronda de selección de los diferentes grupos experimentales.....	35
Figura 9. Reactividad de clonas aleatorias de fagos.....	36
Figura 10. Comprobación de reactividad de clonas positivas	37
Figura 11. Electroforesis de ADN fágico de colonias positivas	38
Figura 12 A. Localización de mimotopos en estructura tridimensional de HA	42
Figura 12 B. Localización de mimotopos en estructura tridimensional de HA	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Tabla de título de clases/subclases de inmunoglobulinas contra VII y título de microneutralización de virus de influenza A H1N1pdm09	31
Tabla 2. Secuencias de péptidos expresados en las clonas de fagos positivas.....	39
Tabla 3. Alineamientos de las soluciones del servidor para ambas cepas de influenza.....	46

1. Resumen

En este trabajo de tesis se estudió el efecto de un conjunto de adyuvantes ampliamente utilizados sobre los títulos de anticuerpos inducidos por la inmunización de ratones con la vacuna comercial de influenza humana, el repertorio de epítomos reconocidos por los mismos y su localización en la estructura tridimensional de la hemaglutinina de influenza, así como la capacidad de los anticuerpos inducidos en neutralizar el virus en cultivos celulares. El conjunto de adyuvantes utilizado comprendió hidróxido de aluminio, saponina, adyuvante incompleto de Freund, Addavax (análogo comercial del MF59) y el péptido GK-1 derivado de *Taenia crassiceps*,

El adyuvante Incompleto de Freund mezclado con la vacuna inactivada de influenza induce altos títulos de IgG1 y en menor grado títulos significativos mayores de IgG2a, 2b e IgM comparado con la vacuna inactivada de influenza sin adyuvante, mientras que cuando se formula la vacuna con AddaVax, induce niveles de anticuerpos IgG2b significativamente superiores que sin adyuvante. La formulación de la vacuna con Al(OH)₃ induce mayores títulos de IgG1 en comparación con la vacuna sola.

Al analizar la capacidad neutralizante de los sueros de los animales vacunados con la vacuna humana de influenza más los diferentes adyuvantes, la vacuna de influenza + saponina indujo la mayor capacidad de neutralización en contra del virus de Influenza A H1N1 pdm09 seguido por los adyuvantes GK-1 y AddaVax adyuvantando a la vacuna de influenza.

Después de la identificación de los epítomos reconocidos por los anticuerpos inducidos contra la vacuna de influenza por medio de una biblioteca péptidos aleatorios en bacteriófagos, los mimotopos reconocidos por los anticuerpos inducidos por la inmunización con la vacuna de influenza sin adyuvante se localizan a lo largo de toda la estructura cristalina de hemaglutinina de influenza, mientras que los anticuerpos inducidos por la inmunización con GK-1, Adyuvante Incompleto de Freund y Al(OH)₃ en combinación con la vacuna de influenza, reconocen en mayor grado epítomos localizados en la cabeza globular de la hemaglutinina y estos epítomos coinciden en múltiples aminoácidos con los comúnmente llamados “sitios antigénicos de influenza”. Este estudio contribuye a un mejor entendimiento de los efectos de los adyuvantes en la respuesta inmune humoral hacia un diseño racional de vacunas.

Summary

The present thesis intends to study the effect of a panel of widely used adjuvants when immunizing mice with the commercial human influenza vaccine on the neutralization antibodies titers, their functionality, and the repertoire of epitope recognition within influenza's hemagglutinin crystal structure and the sera's capability of virus neutralization on cell cultures.

Incomplete Freund Adjuvant mixed with influenza inactivated vaccine induce high IgG1 titers and to a lesser extent, significant levels of IgG2a, 2b, and IgM compared to inactivated influenza vaccine without adjuvant whereas Addavax and influenza vaccine induce statistically significant IgG2b and a trend of higher IgG2a anti influenza antibodies. Al(OH)₃ and influenza vaccine induce high IgG1 antibodies in comparison with influenza vaccine alone.

When analyzing the neutralization capacities of the sera from vaccinated animals, saponin induced the highest neutralization capacity against the Influenza A H1N1 pdm09 virus followed by GK-1 and AddaVax adjuvants.

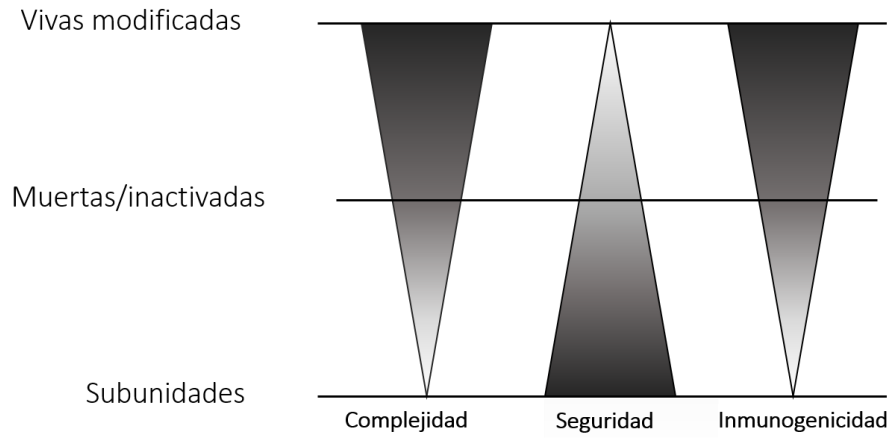
After identification of recognized epitopes from antibodies induced against influenza vaccine through a random peptide phage display library, unadjuvanted influenza vaccine mimotopes localize through the entire crystal structure of influenza hemagglutinin whereas GK-1, Incomplete Freund Adjuvant, and Al(OH)₃ in combination with influenza vaccine, concentrate recognized epitopes at hemagglutinin's globular head and matching several amino acids which belong to the commonly called "Influenza's antigenic sites". This study contributes to a better understanding of adjuvants' effects on immune system for a rational vaccine design.

2. Introducción

Uno de los avances médicos más importantes en la historia moderna ha sido el desarrollo de las vacunas. El primer ensayo hace casi 250 años por Benjamin Jesty en 1774 para vacunar a su esposa y a sus dos hijos usando líquido de pústulas de vacas con viruela como vacuna, logró brindarles inmunidad en contra de la viruela humana (1). Ese descubrimiento fue seguido años después por Edward Jenner en 1796 con la vacunación contra la viruela del joven James Phipps usando pústulas de la ordeñadora Sarah Nelms (2-4). Ambos eventos marcaron una nueva era de vacunación en occidente para la raza humana, así como el comienzo de interminables esfuerzos en investigación para el desarrollo de nuevas vacunas contra cualquier patógeno tanto humano como veterinario. Cabe destacar que, aunque se le atribuyen a Jesty y a Jenner las primeras vacunaciones contra la viruela en humanos, existen descripciones históricas de médicos chinos e hindúes quienes vacunaban contra la viruela intranasalmente entre los siglos XV y XVI (y posiblemente anteriores), usando costras pulverizadas de pacientes que se recuperaban de la enfermedad, siendo este el verdadero origen de la vacunación (3, 5).

Estimaciones hechas por la Organización Mundial de la Salud (6-8) mencionan que las vacunas han disminuido la mortalidad de aproximadamente 2.5 millones de personas anualmente y han reducido considerablemente la morbilidad de un gran número de enfermedades, dejando en claro su utilidad. Posterior al uso de las primeras vacunas de microorganismos de especies animales distintas con similitud a patógenos humanos como las de Jesty y Jenner, se continuó con la formulación de vacunas de microorganismos por medio de atenuación de patógenos, p. ej. el bacilo de Calmette-Guérin (4), el virus de la rabia por Luis Pasteur en 1885 obtenido por desecación de médula espinal de conejos con rabia, o el virus de la fiebre amarilla por Max Theiler en 1935 (9). Posterior al atenuamiento, siguió el desarrollo de la transfección efectiva de células de riñón de mono para la expresión de proteínas recombinantes por células de mamíferos (9). Esta tecnología junto con el uso de vectores virales dio origen a las vacunas obtenidas por recombinación genética; p. ej. las vacunas en contra de la Hepatitis B, VPH e influenza. Cabe recalcar que, durante esta evolución de formular vacunas con microorganismos vivos en un inicio a formularlas con proteínas recombinantes para simplificar su contenido y conocer de manera más precisa los componentes de estas en aras de

aumentar su seguridad e inocuidad, conllevó en general a una reducción en la inmunogenicidad de las vacunas como se resume en la Figura 1.



Modificado de Wilson-Welder, J. *et al*; J Pharm Sci (2009), Vol. 98, No. 4, 1278-1316

Figura 1. Balance entre complejidad, seguridad e inmunogenicidad

En función de la formulación de una vacuna, se tiene un balance entre su complejidad, su seguridad y su inmunogenicidad.

Para revertir la reducción de la inmunogenicidad de las vacunas, los inmunólogos han hecho uso por casi un siglo de moléculas adicionales llamadas “adyuvantes” (del latín *adiuvare* = ayudar) mismos que en palabras del propio Charles Janeway son “el pequeño sucio secreto de los inmunólogos” (10). Estos cumplen la función de potenciar el sistema inmune y lograr en los individuos el desarrollo de una respuesta inmune protectora. Uno de los primeros reportes en la literatura del uso de adyuvantes fue hecho por Gastón Ramón en 1924 adicionando saponinas, almidón, aceite vegetal, cloruro de calcio, etc., a la toxina diftérica para mejorar la respuesta inmune en caballos (11, 12). Asimismo, Alexander Glenny *et al.* en 1932 usando alumbre de potasio ($KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) junto con el toxoide tetánico, desarrollaron la primera vacuna para humanos adicionada con un adyuvante (11, 13-17). Con el paso de los años, un número creciente de vacunas fueron incorporando adyuvantes en su formulación y hoy en día

más de 30 vacunas adicionales con adyuvante que han sido aprobadas para su uso en humanos y su número va en aumento como puede apreciarse en la Figura 2 (12).

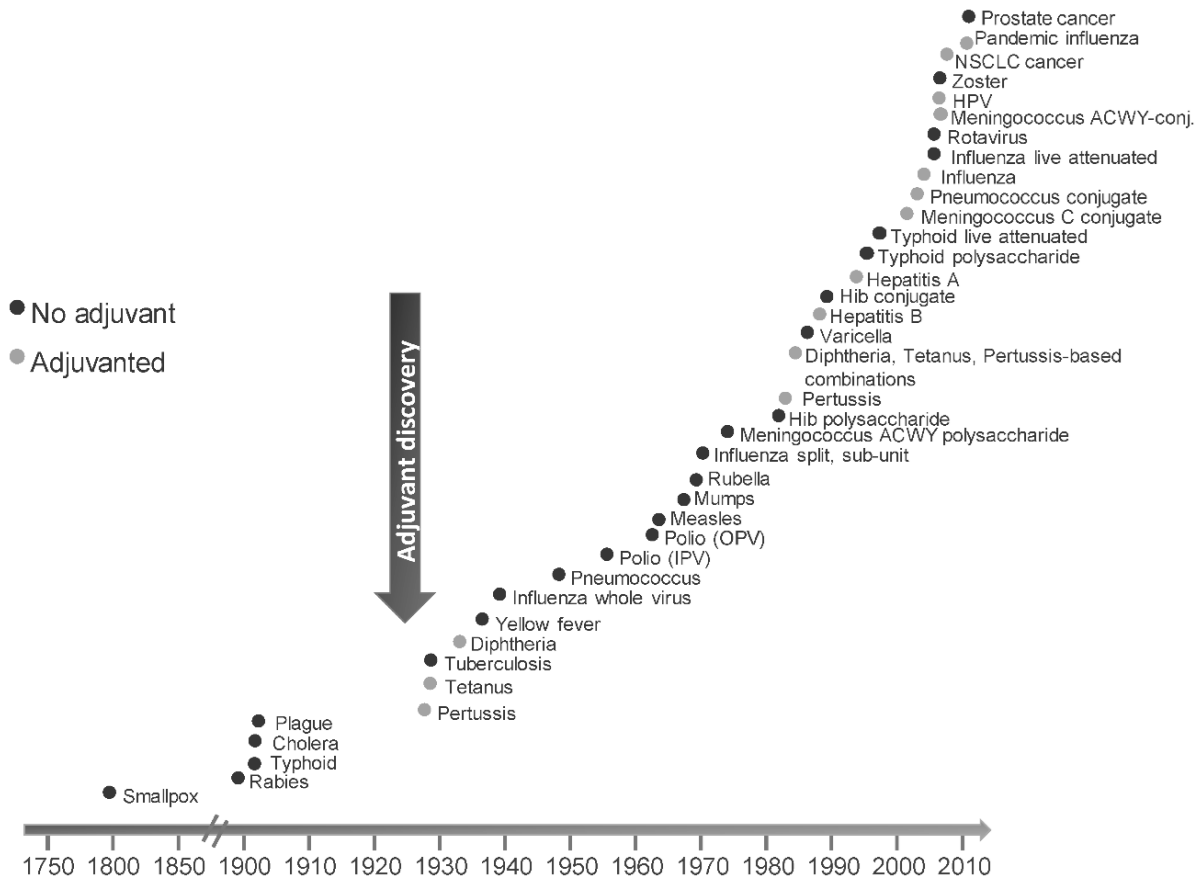


Figura 2. Desarrollo cronológico de vacunas y su formulación con adyuvantes de 1800 a 2015

Mapa cronológico de aprobación de vacunas formuladas con o sin adyuvante. Fuente: Di Pasquale et al. 2015.

Otra de las particularidades de los adyuvantes es que son capaces de inducir una respuesta inmune protectora usando menores cantidades de antígeno (18). Esta pequeña característica brinda a los adyuvantes un valor incalculable en casos donde la cantidad de antígeno es limitada o cuando se requieren enormes cantidades de este para vacunar poblaciones sumamente grandes como lo es el caso de una pandemia. Uno de los ejemplos más claros de tiempos modernos en los que experimentamos la necesidad de vacunaciones masivas, fue durante la pandemia de influenza A H1N1 del 2009; un patógeno con el que, si bien hemos convivido desde aproximadamente 2500 años como lo es el virus de la influenza, en ese año una nueva cepa de gran preocupación puso los ojos del planeta en la necesidad de vacunación mundial e inmediata. Ya que es imposible producir cantidades ilimitadas de antígeno, el hacerlo rendir lo más posible en un momento dado es no solo una opción, sino una imperiosa necesidad. He ahí donde el reducir la cantidad de antígeno necesaria para producir una respuesta inmune protectora en la población y distribuir el antígeno a un número mayor de personas se volvió imprescindible y los adyuvantes fueron parte importante en la carrera por la vacunación universal.

Diez años después , vemos un escenario pandémico de proporciones mucho muy superiores por un patógeno con la aparición de un nuevo virus, el SARS-CoV-2 2019, agente etiológico causante de la enfermedad COVID-19. Es interesante mencionar que todas las vacunas aprobadas hasta el momento contra este virus incorporan adyuvantes en su formulación. El requerimiento de vacunas contra COVID-19 ha promovido también el desarrollo y autorización de nuevos adyuvantes. Tal es el caso de la vacuna contra el COVID-19 “NVX-CoV2373” de la compañía NOVAVAX TM (19) la cual incorpora el adyuvante Matrix-M1[®] que es una mezcla de saponina, colesterol y fosfolípidos junto con la proteína S del coronavirus (20). Aún aquellos desarrollos que utilizan formulaciones que aumentan la inmunogenicidad de los antígenos incorporan adyuvantes en su formulación. Tal es el caso de la vacuna de la compañía Medicago TM la cual formula el antígenos expresado en partículas tipo virus (VLP por sus siglas en inglés) producida en la planta *Nicotiana benthamiana* (21), con el adyuvante AS03 que es una mezcla de aceite de escualeno y α -tocoferol (22).

Actualmente, los adyuvantes pueden clasificarse con base en diferentes criterios, p. ej. su origen, su mecanismo de acción, sus propiedades fisicoquímicas, etc. (23). Clasificándolos

en función de su origen, se resumen algunos de estos adyuvantes en el siguiente recuadro (18, 24-26):

Grupo de adyuvantes:	Ejemplos:
Sales de aluminio:	AlOOH, AlPO ₄ , Al(SO ₄) ₂ ·12 H ₂ O
Productos bacterianos:	Lipopolisacárido (LPS) Monofosforil lípido A (MPLA) Trehalosa dimicolato de micobacterias Muramil dipéptido Toxina de pertussis
Emulsiones aceite en agua (O/W):	Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) MF59
Complejos inmunoestimuladores y sistemas adyuvantes	ISCOMS® AS01 – 04 de GSK S6322® Sigma
Saponinas	Triterpenoides extraídos del árbol <i>Quillaja saponaria</i> .

Fuente: Apostolico J et al., 2016.

Al respecto del mecanismo de acción de los adyuvantes, este depende del tipo de cada uno de ellos. En el caso del hidróxido de aluminio [Al(OH)₃], más correctamente llamado oxihidróxido de aluminio, AlOOH (27), es capaz de adsorber y estabilizar antígenos y lentamente entregarlos a células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés). Debido a esta capacidad de retener antígenos en el sitio de inoculación, al hidróxido de aluminio y adyuvantes de mecanismo similar se les atribuye un llamado efecto de “depósito de antígeno”(28). Posterior de la fagocitosis de los antígenos adsorbidos en los cristales de Al(OH)₃, estos estimulan la activación del inflammasoma NLRP3 por medio de la desestabilización del fagolisosoma (16, 26, 29, 30), aunque estas observaciones son debatidas debido a que también se ha demostrado que su actividad adyuvante puede ser independiente del inflammasoma (26, 31, 32). En el sitio de inoculación, el Al(OH)₃ causa muerte celular ocasionando la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs por sus siglas en inglés) (33), lo que conlleva a la secreción de interleucina-1β, misma que provoca inflamación y reclutamiento de macrófagos, lo que consecuentemente implica la captura y procesamiento de mayor cantidad de antígeno (11, 16, 25).

Respecto al mecanismo de acción del MF59 y el Adyuvante Incompleto de Freund (AIF), ambos generan emulsiones con el antígeno ya sea “aceite en agua” (oil in water) o “agua

en aceite (water in oil)". El que sea de un tipo de emulsión u otro depende solamente la cantidad del elemento mayoritario. El AIF solamente se utiliza en modelos biológicos animales mientras que el MF59 ya se formula en vacunas para humanos desde su autorización en el 2009. En cuestiones de la cinética que sigue el MF59 al ser administrado como adyuvante, a las 3 horas posteriores de la inoculación con el antígeno, una parte del antígeno y adyuvante se detectan extracelularmente en el sitio de inoculación. A las 48 horas, la gran mayoría del MF59 se encuentran intracelularmente en células presentadoras de antígeno DEC-205⁺ (por lo que presume aumenta la captura del antígeno). Así mismo, a las 48 horas también se detecta MF59 y antígeno en nódulos linfáticos periféricos teniendo efecto en la cantidad y duración de los centros germinales (35-37). El MF59 y el AIF también causan inflamación lo cual aumenta la producción de TNF- α favoreciendo el reclutamiento de células polimorfonucleares, eosinófilos, monocitos en el sitio de inoculación y más tarde células dendríticas, aumentando así la captura y potencial presentación de más antígeno (29, 38-40).

Al respecto de las saponinas como adyuvantes, estos son triterpenoides comúnmente extraídos de la planta *Quillaja saponaria*, aunque se pueden aislar de un amplio número de plantas y algunos organismos marinos. Son un grupo diverso de moléculas complejas que varían en cierto grado en su estructura; sin embargo, en general se puede decir que están compuestas por una parte de aglicona (que es un flavonoide) no de tipo carbohidrato unidas a cadenas de carbohidratos distintos y teniendo o no un grupo de triterpenoides o de tipo esteroideas (41).

Las saponinas son usadas como adyuvantes veterinarios, aunque actualmente, la vacuna contra el COVID-19 Novavax® recientemente aprobada para su uso de emergencia en Indonesia, utiliza un adyuvante llamado Matrix-M basado en estos compuestos (42). Las saponinas montan una fuerte respuesta inmune tipo Th1 y Th2 e inducen la producción de anticuerpos por medio de mecanismos que aún no se tienen claros (16, 29, 43, 44). Al respecto de su mecanismo de acción, aparentemente depende del grupo aldehído de la aglicona, el cual posiblemente se une a algún receptor desconocido en células del sistema inmune dando como resultado la activación del sistema inmune, particularmente de la respuesta de tipo Th1; sin embargo, otros tipos de saponinas distintas a Quil A (la más usada y más investigada) muestran que estas otras pudieran no depender del grupo aldehído para tener propiedades adyuvantes y también, tener una capacidad hemolítica menor (41). Aunado a esto, también se piensa que

causan inflamación en el sitio de inoculación con el consecuente reclutamiento de células inflamatorias.

Otros ejemplos de vacunas adicionadas con adyuvante comercializadas hoy en día son Fendix® para Hepatitis B y Cervarix® para el VPH, las cuales contienen MPL como inmunopotenciador.

En nuestro laboratorio hemos demostrado la efectividad del péptido sintético GK-1 derivado del parásito *Taenia crassiceps*, como un adyuvante para emplearse con la vacuna de influenza humana. GK-1 aumenta la inmunogenicidad de la vacuna incrementando los niveles de IgA e IgG en ratones envejecidos así como la protección de ratones jóvenes y seniles (45, 46).

A pesar del amplio repertorio de moléculas adyuvantes y la intensa investigación para entender los mecanismos detrás de su capacidad inmunoestimuladora, aún quedan muchas preguntas por resolver sobre el efecto específico de cada tipo de adyuvante en la respuesta inmune humoral; en particular, aún falta mucho por conocer al respecto del efecto de los adyuvantes en la especificidad del repertorio de epítomos reconocidos y su efecto en la funcionalidad de los anticuerpos inducidos. Un único estudio que explora el efecto de los adyuvantes en la respuesta inmune inducida por la vacuna de influenza en humanos fue recientemente reportado por Khurana y colaboradores en donde la administración de la vacuna de influenza junto con el MF59, modifica los epítomos que se reconocen por los anticuerpos generados tras la vacunación, esto determinado por medio de una biblioteca de fagos de la cabeza globular de la hemoglobina y el tallo (HA1 y HA2)

De lo anterior se deriva el problema del aún pequeño conocimiento que tenemos de cómo los adyuvantes afectan a los anticuerpos que se generan tras la vacunación en el contexto de los epítomos que reconocen en contra del antígeno inoculado.

3. Justificación

Los adyuvantes son herramientas que utilizamos desde hace más de un siglo en la formulación de vacunas. Los adyuvantes son componentes adicionales a los componentes vacunales provenientes del patógeno en cuestión que se utilizan para formular las vacunas y aumentar su eficiencia. Actualmente, se ha aumentado el conocimiento de los mecanismos que median las propiedades adyuvantes de diferentes moléculas; sin embargo, poco se ha explorado de su diferente capacidad para modular la inmunidad específica inducida. Con el objeto de profundizar en el conocimiento de los adyuvantes como inmunopotenciadores, este proyecto de investigación estudió el efecto de un panel de adyuvantes sobre los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos por la inmunización de ratones con la vacuna comercial de influenza humana y el repertorio de epítomos reconocidos dentro de la estructura cristalina de la hemaglutinina de influenza, así como la capacidad neutralizante de estos anticuerpos en ensayos *in vitro*. La información generada por este trabajo podría contribuir al diseño racional de vacunas adyuvantadas.

4. Hipótesis

El uso de los diferentes adyuvantes administrados en conjunto con la vacuna contra influenza humana en ratón, modificará diferencialmente los títulos de clases y subclases de anticuerpos, así como el repertorio de epítomos reconocidos en las moléculas de hemaglutinina de las diferentes cepas de influenza inoculadas, impactando de manera específica en su capacidad neutralizante.

5. Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de la vacuna comercial contra influenza humana junto con un panel de adyuvantes en la respuesta inmune humoral de ratones jóvenes de la cepa Balb/cAnN.

6. Objetivos específicos

- Analizar el efecto de los adyuvantes en los títulos de anticuerpos de las distintas clases y subclases de inmunoglobulinas específicas contra la vacuna comercial para la influenza humana.
- Evaluar la capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos.
- Evaluar el efecto de los adyuvantes sobre el repertorio de epítomos de la hemaglutinina viral reconocidos por los anticuerpos generados tras la vacunación.
- Determinar la proporción de los anticuerpos que reconocen específicamente la cabeza globular de hemaglutinina en relación con el total de anticuerpos que reconozcan diferentes regiones en la totalidad de las moléculas presentes en la vacuna.

7. Materiales y métodos

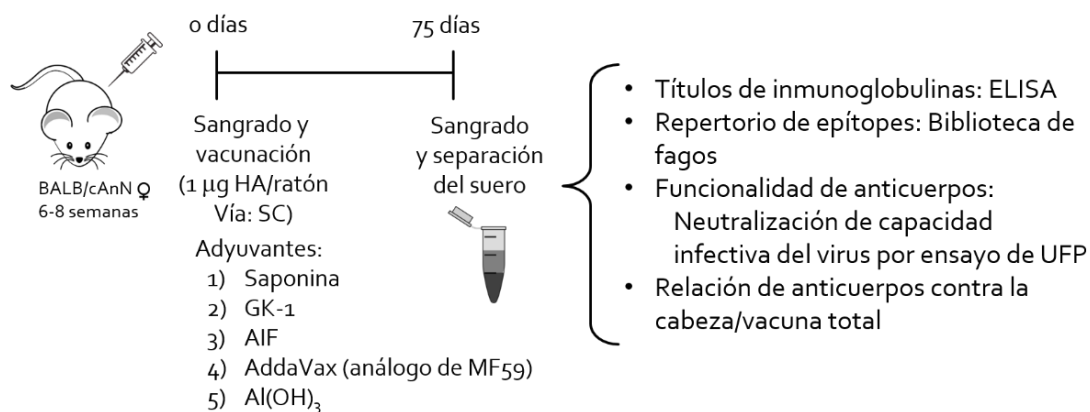
- **Ratones:** Todos los animales fueron criados en la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los experimentos se realizaron siguiendo los lineamientos nacionales estipulados en la Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999 y en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (“Guide for the Care and Use of Laboratory Animals”, National Research Council, Washington, D.C., EUA., 2011) de acuerdo con los estándares éticos internacionales y aprobado por el Comité de Bioética del Instituto (# Protocolo: 95).
- **Vacunación:** Siete grupos de siete ratones Balb/cAnN hembras de 6 – 8 semanas de edad fueron inoculados por vía subcutánea en el flanco dorsal con 1 µg de HA total de la vacuna trivalente inactivada anti influenza (VII) de virión fragmentado e inactivado Fluarix® para adulto (Glaxo Smith Klein) diluido en solución salina isotónica inyectable (SSI). Dicha vacuna está formulada con viriones de las cepas de influenza siguientes: Cepa tipo A/California7/2009 (H1N1) pdm09, cepa tipo A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) y cepa tipo B/Phuket/3073/2013. Dicha dosis fue inoculada sola o junto a un único adyuvante. Los adyuvantes empleados fueron saponina (Sap) (Sigma), Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) (Sigma), análogo comercial de MF59 “AddaVax®”, hidróxido de aluminio [Al(OH)₃]¹ y GK-1 (péptido derivado de *Taenia crassiceps* del cual nuestro laboratorio ha reportado anteriormente actividad adyuvante) (45, 46). El péptido GK-1 fue sintetizado químicamente por USV Ltd, Bombay, India.

Para cada ratón, los adyuvantes independientes inoculados con la vacuna se administraron de la siguiente manera: 50 µg de saponina disuelta en SSI directamente mezclada con la VII; AIF, AddaVax y Al(OH)₃ mezclados directamente con la VII en proporción 1:1 a un volumen final de 200 µl. Para GK-1, se administraron 10 µg del

¹ Generosamente donado por el Dr. Juan Garza Ramos, Director General de la Productora Nacional de Biológicos Veterinarios, PRONABIVE.

péptido disuelto en SSI y se inocularon por separado en el flanco dorsal opuesto al que se administró la VII como previamente hemos reportado (45, 46). Los ratones fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* y monitoreados diariamente. Se extrajeron muestras de sangre a los 45 y 60 días posteriores a la vacunación y una sangría terminal al día 75. Los sueros de cada ratón fueron separados por centrifugación, alicuotados y congelados a -20°C hasta su uso. El siguiente diagrama esquematiza la estrategia empleada en el proyecto.

Estrategia experimental



- **Título de anticuerpos anti influenza:** Para todas las clases y subclases de inmunoglobulinas, se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 pozos de fondo plano (NUNC) con $0.1 \mu\text{g}$ de hemaglutinina por pozo de la VII diluida en buffer de carbonatos (NaHCO_3 0.04523 M , Na_2CO_3 0.18115 M) $\text{pH}=9.5$ por 18 h a 4°C , se lavaron tres veces con PBS-Tween 0.3% (PBST) en un lavador de placas ELx405 (BioTek), se bloquearon con PBS-BSA 1% (PBSB) por 1 h a 37°C y se lavaron nuevamente tres veces con PBST. Acto seguido, en la columna 1 de la placa se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de una dilución 1/100 en PBST del suero de cada ratón y $50 \mu\text{l}$ de PBST en el resto de los pozos de la placa de ELISA (columnas 2 a 12); después, se diluyeron los sueros lateralmente 1/2 hasta llenar la placa y se incubaron estas 1 h a 37°C seguido de tres lavados con PBST. Para la determinación de clases/subclases de inmunoglobulinas (Ig), se adicionó la dilución del anticuerpo secundario respectivo en PBST de la siguiente manera: cabra anti ratón (GAM) IgG1-AP 1:20 000, GAM IgG2a-AP 1:2000, GAM IgG2b-AP 1:20 000

(Thermo Scientific) y GAM IgM-AP 1:20 000 (BD Pharmigen) y se incubaron las placas 1 h a 37°C seguido de tres lavados con PBST. Una vez lavadas las placas se adicionó 100 µl del sustrato *p*-nitrofenil fosfato (pNPP) (Sigma) diluido en buffer de dietanolamina (DEA, dietanolamina 1 M, azida de sodio 3 mM, pH=9.8) a una concentración final de 1 mg/ml a toda la placa, se incubaron estas el tiempo y a la temperatura indicados por el proveedor leyéndose la reacción a 405 nm en un espectrofotómetro para placas Epoch (BioTek). Para determinar los títulos de cada clase o subclase de anticuerpo, se graficaron las curvas del log₂ de la dilución (X) vs. la densidad óptica (DO) de la lectura en ELISA (Y) para cada clase o subclase por ratón. A partir de la ecuación de la recta de cada curva, se calculó el título de anticuerpos de la siguiente manera:

$$\text{anti log}_2 X = [Y - b] / m$$

donde Y es igual al promedio + 3 desviaciones estándar (DE) de la lectura de la DO del grupo control (inoculado solo con solución salina o solución salina con el adyuvante).

Para estudiar el porcentaje de IgG1 reaccionando contra la cabeza globular, se sensibilizaron placas de ELISA con 0.1 µg/pozo de cabeza globular de hemaglutinina recombinante de Influenza B (Sino Biological, Cat: 40016-V08H1) o 0.1 µg/pozo de la vacuna total de influenza humana de GSK y se procedió conforme al protocolo de ELISA anteriormente indicado. El porcentaje de IgG1 dirigida contra la cabeza globular de hemaglutinina se determinó dividiendo la lectura de densidad óptica (DO) de IgG1 de los sueros de cada grupo experimentales contra la cabeza globular recombinante como antígeno en la placa dividido entre la DO de IgG1 de los sueros contra la VII como antígeno sensibilizando la placa y multiplicando el cociente por 100. Dicho cociente se determinó para los sueros de 60 y 75 días.

- **Título de microneutralización de anticuerpos anti influenza:** Los sueros de todos los grupos experimentales fueron evaluados en su capacidad de neutralización de la infección del virus de influenza A pandémica H1N1pdm09 a un cultivo celular. El virus fue aislado en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) durante el brote en México del año 2009 y un lote fue cultivado en células MDCK del cual, el

sobrenadante de 48 horas posterior a la infección de las células fue cosechado, dividido en pequeñas alícuotas en crio viales y congelado en la fase líquida de nitrógeno líquido hasta su uso. Previo a los ensayos, se determinó el TCID₅₀ del lote de virus por triplicado.

- Previo al ensayo de microneutralización, se inactivó el complemento en los *pooles* de sueros de todos los grupos experimentales incubándolos en baño maría a 56°C por 30 minutos separándolos en pequeñas alícuotas y congelándolos a -20°C hasta su uso. El día anterior al montaje del ensayo de microneutralización, se sembraron 50 000 células/pozo de células MDCK en un volumen de 100 µl en placas de cultivo celular de poliestireno de 96 pozos de fondo plano con tapa (Corning) y se incubaron a 37°C, 5% CO₂. A la mañana siguiente, se confirmó al microscopio que las células se encontraran sanas y confluentes.
- Para el ensayo de microneutralización, en una nueva placa de cultivo celular, se hicieron diluciones 1:2 partiendo de 1:400 hasta 1:100,000 en un volumen de 50 µl; posteriormente, se adicionaron a cada pozo 50 µl de una dilución recién preparada del virus de influenza A (H1N1)pdm09 con 100 TCID₅₀ en medio de dilución de virus (MEM, 0.5 µg/ml tripsina-TPCK, 0.03% BSA). La placa de la mezcla virus-suero fue incubada 1h a 37°C, 5% CO₂. Minutos antes de que terminara la incubación de la placa de virus-suero, se lavó 3 veces cada placa de células MDCK a utilizar y una vez lavadas y habiendo retirado el medio de cultivo, se transfirió completamente la mezcla neutralizada del virus-suero a la placa de células recién lavada, y esta se incubó 24 – 48 h a 37°C, 5% CO₂. Todas las placas incluyeron control de células sin tratamiento y células infectadas con el virus sin neutralizar como controles negativo y positivo respectivamente. Una vez terminada la incubación y de observar efecto citopático en la monocapa de células, estas se fijaron con formaldehído 10% 2 h a 4°C, se tiñieron con cristal violeta y después de ser lavadas profusamente, se secaron al aire. Para la interpretación, un analista especializado realizó la lectura de presencia o ausencia de efecto citopático en un ensayo ciego y se definió como el título neutralizante a la última

dilución de suero capaz de inhibir totalmente la aparición de efecto citopático. Se define como efecto citopático a alteraciones en la monocapa de células MDCK como elevaciones, huecos o modificaciones en la morfología normal de las células individuales, *i.e.* aparición de una mayor granularidad al interior de las células.

- **Selección de biblioteca de péptidos aleatorios en fago (RPL):** Se utilizó la biblioteca comercial de péptidos aleatorios en bacteriófagos de 7 aminoácidos lineales (Ph.D.-7 RPL) de New England Bio Labs (NEB®) para monitorear los *pooles* de sueros de cada uno de los diferentes grupos experimentales. En la Figura 3 se muestra un esquema de la estructura del bacteriófago base (también llamado fago) usado para la expresión de péptidos aleatorios. Para la selección de clonas de fagos de cada *pool* de sueros de los diferentes grupos experimentales, se procedió conforme al esquema de la Figura 4. Dicha selección se realizó para cada grupo experimental sensibilizando cuatro pozos de una microplaca de 96 pozos de poliestireno (NUNC) con 0.2 µg/pozo de anticuerpo GAM IgG Fc (Sigma) en buffer de carbonatos pH=9.5 por 1 h a 37°C. Los pozos fueron lavados cuatro veces con PBS-Tween 0.3% (PBST) con un lavador de placas ELx405 (BioTek) y fueron bloqueados con PBS-leche descremada 2% (PBSL) por 1 h a 37°C seguido de cuatro lavados con PBST. Posteriormente, una dilución del *pool* de sueros respectivo 1:100 en PBSL-Tween 0.2% (PBSLT) fue colocada en cada pozo de la placa y fue incubada 1 h a 37°C; simultáneamente, una dilución de 400 µl de la biblioteca de fagos en PBSL a una concentración final de $1 \times 10^9 - 1 \times 10^{11}$ UFP/pozo se incubó aparte 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez transcurrida la incubación de la placa sensibilizada con los sueros, se lavó cinco veces con PBST y se adicionó 100 µl de la dilución del fago a cada uno de los 4 pozos. Posteriormente, se selló la placa y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la placa fue lavada siete veces con PBST y los fagos capturados en la placa fueron eluidos con buffer de Glicina-HCl 5 minutos a temperatura ambiente y seguido de una incubación de 10 minutos a 37°C. El sobrenadante de los pozos se colectó en un tubo de micro-centrífuga y se neutralizó inmediatamente con 20 µl de Tris-base 2M. A partir de este sobrenadante neutralizado de fagos eluidos, 360 µl fueron inoculados a 50 ml de un cultivo de toda la noche de *E. coli* TG1 en caldo de cultivo 2xYT y se incubó inicialmente a 37°C estático y

posteriormente 4.5 horas a 37°C, 250 rpm en una incubadora con agitación orbital (Lab-Line) para la amplificación de los fagos. El resto del sobrenadante de fagos eluidos se conservó a 4°C hasta la determinación del título de fago por ronda de selección. Transcurrido el tiempo de amplificación, se sedimentaron las bacterias en una ultracentrífuga refrigerada (Beckman) por 10 min, 10,000 rpm (~9630xg), 4 °C y el sobrenadante conteniendo los fagos fue colectado en un nuevo tubo de ultracentrífuga estéril añadiendo 1/5 del volumen de buffer PEG/NaCl, se mezcló y se incubó toda la noche a 4°C. A la mañana siguiente los fagos fueron ultracentrifugados por 10 min a 10,000 rpm (~7850xg), 4°C y el botón de fagos sedimentado fue resuspendido en 500 µl de TBS estéril seguido de dos ciclos de centrifugado en una micro centrífuga de escritorio de 10 min a 13,000 rpm (~16100xg) para terminar la ronda de selección. Se realizaron un total de tres rondas de selección para cada *pool* de sueros de los diferentes grupos experimentales y el sobrenadante previo y posterior al proceso de amplificación de fagos fueron titulados como control de amplificación.

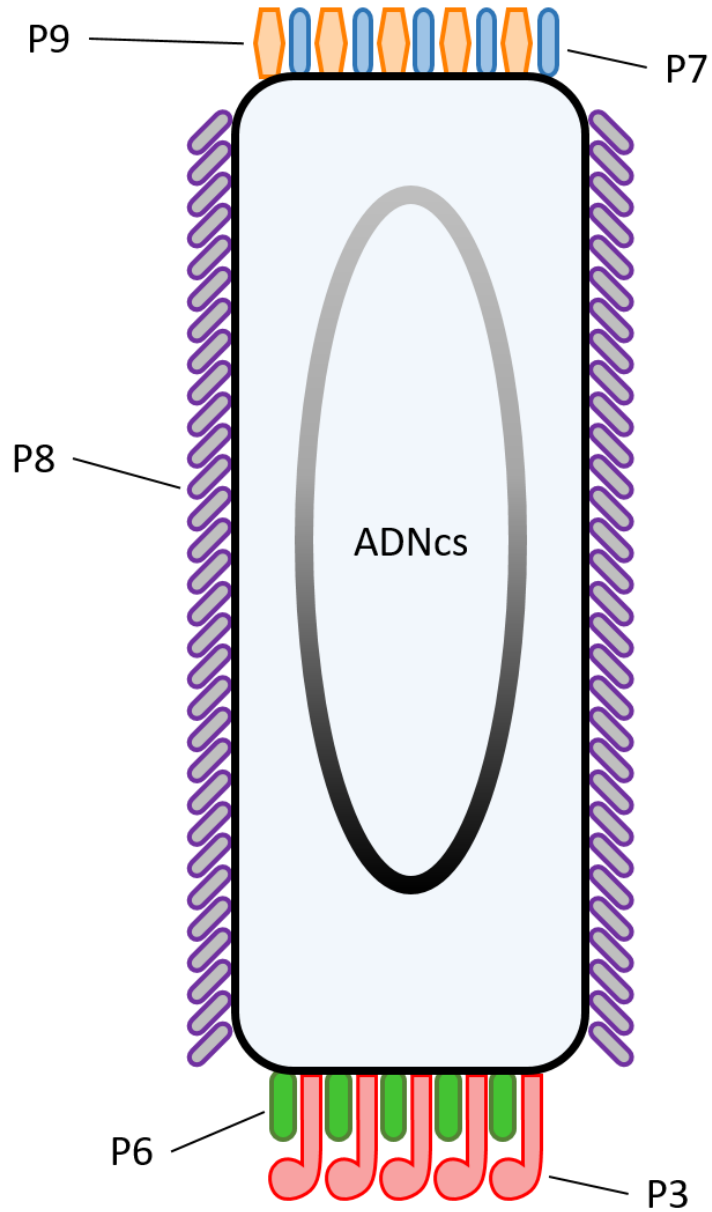


Figura 3. Diagrama de bacteriófago M13 silvestre

La biblioteca de péptido de NEB® utiliza este fago como base y expresa un péptido lineal de 7 aminoácidos aleatorios en la proteína P3.

Procedimiento de “biopanning”.

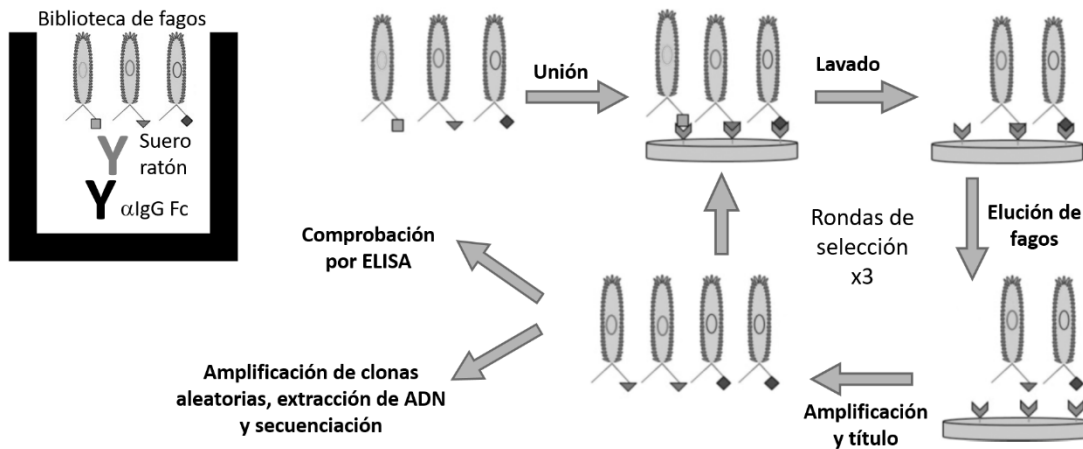


Figura 4. Diagrama de flujo de las rondas de selección del procedimiento de “biopanning”

Resumen del proceso de Biopanning para biblioteca de péptidos aleatorios expresados en bacteriófago M13 de NEB®.

- **Reactividad de clonas de fagos seleccionadas con sueros de animales vacunados:** A partir de la placa de medio de cultivo del título de fagos de la tercera ronda de selección, se eligieron de manera aleatoria quince clonas de fagos de cada grupo experimental. Dichas clonas fueron “picadas”, amplificadas, purificadas y se determinó la cantidad de proteína total por método de Lowry.

Para cada grupo experimental se sensibilizaron pozos por duplicado por clona de fago a probar en placas de poliestireno de fondo plano de 96 pozos (NUNC) con 10 µg de proteína total por pozo diluido en buffer de carbonatos pH = 9.5 por 1 h a 37°C. Una vez transcurrida la incubación, se lavaron seis veces con PBS-Tween 0.3% (PBST*) usando un lavador de placas ELx405 (BioTek) y las placas se bloquearon con PBSL por 1 h a 37°C; después, se lavaron seis veces con PBST* y se adicionaron 100 µl por pozo de una dilución 1:200 del *pool* de sueros con el cual fue seleccionada la clona diluido en PBSM-Triton X-100 0.2% (PBSMT) incubando la placa por 1 h a 37°C. Se lavaron las placas seis veces con PBST* y se adicionaron 100 µl por pozo de una dilución 1:2500 de anticuerpo secundario cabra anti-ratón (GAM)-HRP (Thermo

Scientific) en PBSLT. Se incubaron las placas por 1 h a 37°C y transcurrido el tiempo, se lavaron seis veces. Por último, se adicionaron 100 µl de tetrametilbencidina (TMB) por pozo (Life Technologies), se incubó la placa 10 min a 37°C y la reacción se detuvo con 100 µl de una dilución 0.2 M H₂SO₄ (Sigma) y se leyó a 450 nm en un lector de placas Epoch (BioTek). Se estableció como línea de corte el promedio más 3 desviaciones estándar ($\bar{X} + 3 DE$) (Figura 9, línea punteada) de la señal de reactividad de las clonas contra el suero de animales inoculados solo con SSI o el adyuvante solo (sin la vacuna); es decir del control negativo respectivo de cada grupo, lo que representa el 99.7% de la población negativa. Todas las clonas que reaccionaron más allá de la línea de corte se consideraron como positivas y se corrieron nuevamente para confirmar su especificidad en contra del suero contra el cual fueron seleccionadas y para descartar falsos positivos.

- **Extracción de ADNcs fágico y secuenciación:** A todas las clonas de fago confirmadas como positivas en su reactividad contra el *pool* de sueros contra el cual fueron seleccionadas, se les extrajo el ADN de cadena sencilla (ADNcs) conforme al método de yoduro de sodio indicado por NEB®. Los extractos de ADNcs fueron corridos en gel de agarosa 0.8% preteñido con SYBR green (Thermo) dilución 1:10,000 a 100 V y documentado con un transiluminador MiniBIS Pro (DNR) para confirmar su pureza. La cantidad y calidad del ADNcs extraído de los fagos seleccionados, se determinó usando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo®) y secuenciado (Genetic Analyzer 3500xL, Applied Biosystems®) en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud de la UNAM usando el cebador -96 gIII indicado por NEB® (5'-^{HO}CCCTCATAGTTAGCGTAACG -3') en el manual del producto. Una vez secuenciadas las clonas, se copió la secuencia complementaria y reversa reportada del electroferograma, se introdujo en un programa para determinación de sitios de restricción y se localizó el sitio de restricción EagI. Muy cercano a este sitio de restricción, se localizó río arriba el péptido aleatorio expresado en cada clona en el marco de lectura correcto precedido por la marca inicial de aminoácidos “-HS-” seguido de los siete aminoácidos correspondientes al péptido aleatorio en la clona y sucedidos por el triplete de aminoácidos “-GGG-“, (p. ej. – HS – SSELPLGY – GGG –).

- **Predicción bioinformática de epítomos/mimotopos conformacionales:** La predicción de mimotopos conformacionales se realizó usando el servidor público Episearch (<http://curie.utmb.edu/episearch.html>) (47) para desarrollar una metodología de análisis bioinformático desarrollada por el Dr. Ricardo A. Vázquez Ramírez del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Brevemente, las imágenes moleculares y los análisis fueron realizados usando el software UCSF Chimera versión 1.13.1 (48). Se descargaron las estructuras cristalinas de HA de influenza humana A H1N1 pdm09 e influenza B/Brisbane (influenza B) del Protein Data Bank (PDB: www.rcsb.org). Para el caso de influenza A H3N1/2013, se encontró en la base de datos una estructura cristalina de la cepa exacta presente en la vacuna (PDB: 6PDX). De las estructuras cristalinas de influenza A H1N1 pdm09 e influenza B descargadas de la PDB, se seleccionaron las mejores estructuras de acuerdo con los siguientes criterios: estructuras de HA conteniendo ambas cadenas peptídicas [HA1 (cadena A) and HA2 (cadena B)] formando un complejo, que no tuvieran mutaciones experimentales en especial en aminoácidos importantes como los pertenecientes a sitios antigénicos, que no estuvieran formando complejo con otro ligando o anticuerpo. Todas aquellas estructuras que no cumplieran con los criterios fueron descartadas. El análisis estructural de influenza A H1N1 se llevó a cabo con los siguientes cristales reportados en la PDB: 3M6S, 4LXV, 4M4Y, 3UBQ, and 4JU0. Se calculó el error de raíz media cuadrática (Root-Mean-Square-Deviation, RMSD) para cada uno de los cristales de influenza A H1N1 para determinar su similitud entre ellos eligiendo 3M6S para influenza A H1N1 y 4FQM para influenza B como los mejores cristales para los alineamientos. La posible localización de la secuencia expresada en cada una de las clonas de fago en la estructura de HA se corrió en el servidor Episearch contra 3M6S y 4FQM y todos los mimotopos predichos por el servidor fueron filtrados tanto en función de su puntaje como que contuvieran el mayor número de aminoácidos coincidentes con las regiones antigénicas de HA en ambas cepas. Los aminoácidos pertenecientes a los sitios antigénicos fueron consultados de la literatura para influenza A (49-55) e influenza B (56-59). De las soluciones del servidor restantes, aquellas que presentaran impedimento estérico a la unión de los anticuerpos por localizarse al interior de la estructura tridimensional del trímero de HA fueron descartadas y la solución con el mayor número de coincidencias

con los aminoácidos de los sitios antigénicos de HA y mayor puntaje fue elegida como el mimotopo más probable para cada una de las estructuras tridimensionales de influenza A H1N1, Influenza A H3N2 e influenza B.

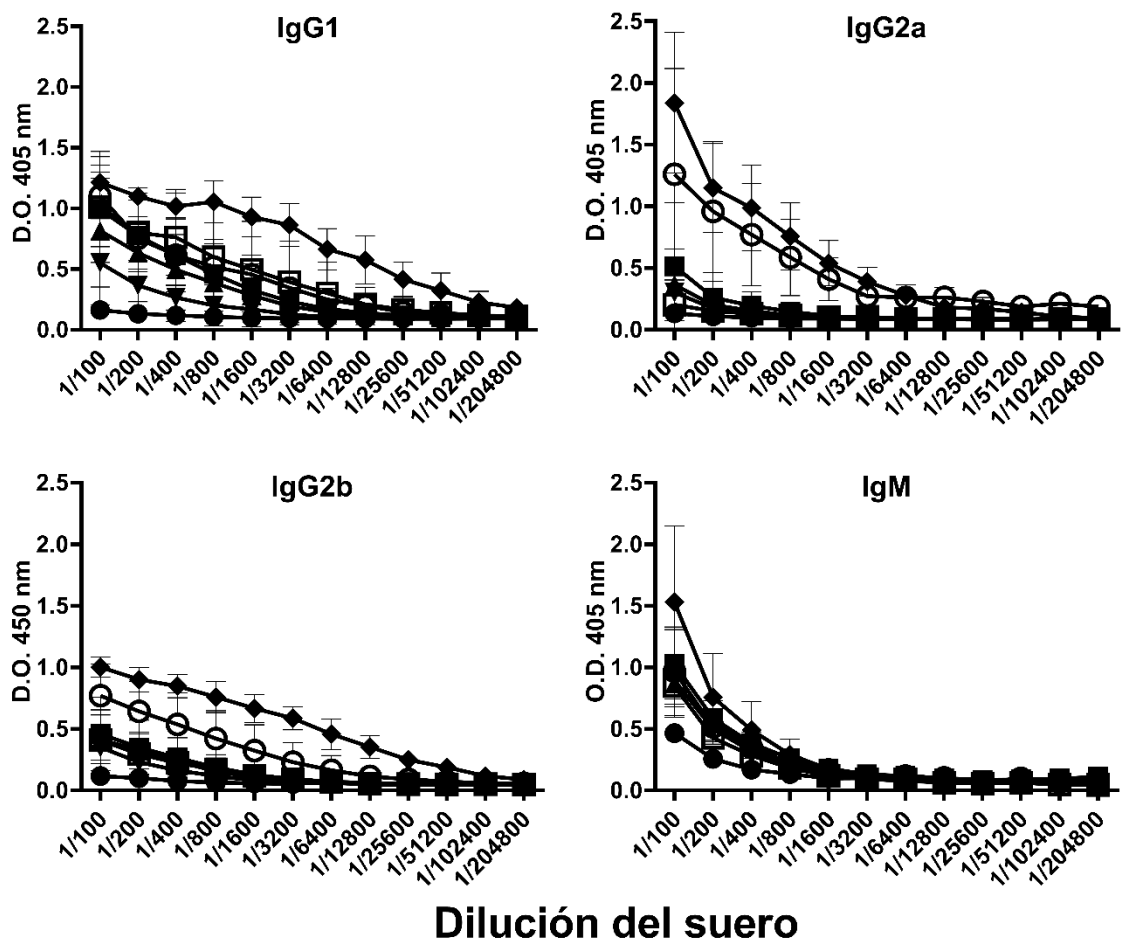
- **Análisis estadístico:** Todo el análisis estadístico se realizó con el software GraphPad Prism versión 7.00. Para las determinaciones de los títulos de inmunoglobulinas y los títulos de microneutralización, se usó un ANOVA de una vía seguido de una prueba *post hoc* de Dunnett comparando cada uno los grupos experimentales con el grupo de vacuna de influenza sin adyuvante adicionado. Un valor de $P < 0.05$ se consideró como significativo. $P^* < 0.005$, $** < 0.0001$.

8. Resultados

8.1. Título de clases y subclases de Igs medidos por ELISA

La vacunación de los animales con la VII ya sea sola o en conjunto con los adyuvantes utilizados, indujo la producción de anticuerpos específicos de diferentes clases y subclases. Midiendo los títulos de IgG1, la VII+AIF fue la que indujo los títulos más altos de esta subclase de inmunoglobulina (Figuras 5 y 6 y Tabla 1) alcanzando un título de 1:98 479 (Tabla 1) seguido por VII+AddaVax y VII+Al(OH)₃ los cuales tuvieron títulos de 1:6 059 mientras que VII+Sap y VII+GK-1 tuvieron títulos muy inferiores a la VII sin adyuvante que tuvo un título de 1:3 950 (Tabla 1). Para el caso de la IgG2a los títulos más altos se alcanzaron con VII+AddaVax y con VII+Al(OH)₃ cuyo título final fue de 1:14,931 seguido por VII+AIF, con un título final de 1:13,637 (Tabla 1). En el caso de la IgG2b, VII+AIF alcanzó el título más alto con un valor de 1:64,745 seguido por VII+AddaVax y VII+Al(OH)₃, los cuales, tuvieron títulos de 1:8 738 (Tabla 1). En el caso de IgM, ninguno de los grupos experimentales tuvo un título superior al grupo control de VII sin adyuvante. No se reportan los títulos de IgG3 ya que fueron prácticamente 0 para todos los grupos experimentales. Debido a que las principales subclases de inmunoglobulina que rigen la protección contra la infección de influenza son IgG1 e IgG2a a nivel de sangre y que son el estándar con el cuál se estudia y mide serológicamente la eficacia de anticuerpos contra influenza, decidimos omitir la IgA del estudio (60).

Para todas las clases/subclases de inmunoglobulinas cuyo título fue determinado, los *pools* de sueros de los grupos de VII+Sap y VII+GK-1 presentaron valores considerablemente inferiores a los del grupo control de VII sin adyuvante.



- SSI ■ VII ▼ VII + GK-1 ▲ VII + Sap
- ◆ VII + AIF ⊖ VII + AddaVax □ VII + Al(OH)₃

Figura 5. Título de clases y subclases de inmunoglobulinas determinador por ELISA

Curvas de títulos de anticuerpos de los *pools* de sueros a los 75 días post vacunación medidos por ELISA.

A) Título de clases y subclases de anticuerpos específicos

	VII	VII + Sap	VII + GK-1	VII + AIF	VII + AddaVax	VII + Al(OH) ₃
IgG1	1:3,950 ± 3.93	1:277 ± 30.71	1:353 ± 10.59	1:98,479 ± 4.41 *	1:6,059 ± 1.92	1:8,185 ± 17.20
IgG2a	1:233 ± 43	1:49 ±2.11	1:18 ± 8.47	1:13,637 ±2.13 **	1:14,931 ± 2.45	1:4 ± 2.59
IgG2b	1:1,307 ± 18.92	1:844 ±4.64	1:317 ± 3.42	1:64,745 ±2.35 **	1:8,738 ± 4.43 *	1:847 ± 11.37
IgM	1:1,644 ± 2.14	1:1,007 ± 1.73	1:912 ± 1.67	1:2,852 ± 4.09 *	1:1,222 ±2.29	1:647 ± 2.20

B) Títulos de neutralización de virus de influenza A H1N1pdm09 en ratones vacunados

	VII	VII + Sap	VII + GK-1	VII + AIF	VII + AddaVax	VII + Al(OH) ₃
SSI						
<1:400	1:800	1:3,200 ****	1:1,600 *	1:400	1:1,600 *	1:800

Tabla 1. Tabla de título de clases/subclases de inmunoglobulinas contra VII y título de microneutralización de virus de influenza A H1N1pdm09

A) Título de anticuerpos en suero específicos contra la vacuna de influenza humana.

B) Título de neutralización de *pools* de sueros contra el virus de influenza A (H1N1) pdm09. ANOVA de una vía con prueba *post hoc* de Dunnett comparando con la VII sin adyuvante adicionado. $P^* < 0.005$, $** < 0.0001$.

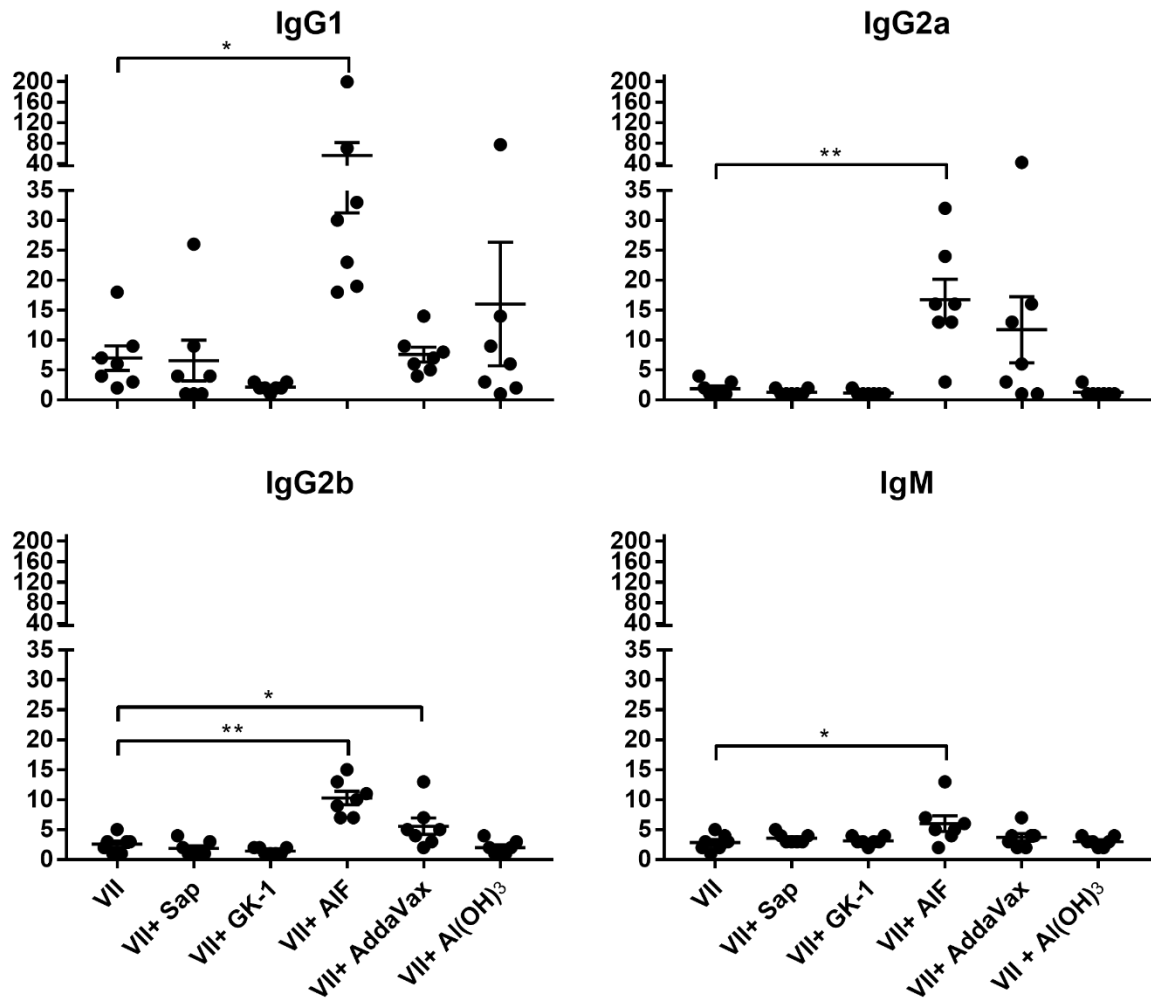


Figura 6. Gráfica de puntos de título de las diferentes clases/subclases de inmunoglobulinas de la Tabla 1 A

Título de anticuerpos de las diferentes clases/subclases de inmunoglobulinas generadas tras la vacunación con las VII sola o adicionada con los diferentes adyuvantes derivado de la Tabla 1A. $P^* < 0.005$, $** < 0.0001$.

8.2. Capacidad de neutralización del virus de influenza

Por medio de un ensayo de microneutralización, se determinó la capacidad de los sueros de interferir la capacidad de infección del virus de influenza A (H1N1) pdm09 en células MDCK. El *pool* de sueros de VII+Sap alcanzó el título de neutralización más alto con un valor de 1:3,200 seguido por los *pools* de sueros de VII+GK-1 y VII+AddaVax que alcanzaron títulos de 1:1,600. Los grupos de VII+AIF y VII+Al(OH)₃ tuvieron títulos iguales o inferiores a la VII sin adyuvante (Tabla 1 B). En la Figura 7 se muestran imágenes representativas de una monocapa de células saludables (A), de una monocapa de células inoculada con virus neutralizado con una dilución de suero que protege de la infección viral (B) y con una dilución de suero no protectora (C).

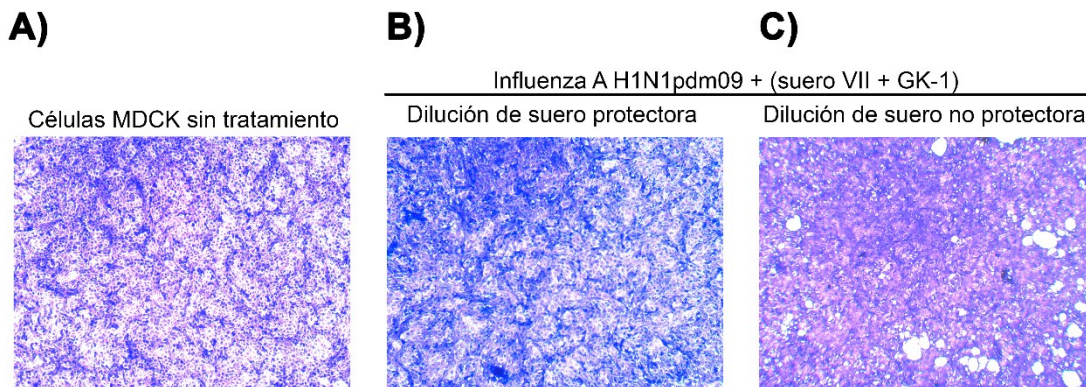


Figura 7. Ensayo de microneutralización de virus de influenza A H1N1pdm09 por “pools” de sueros

Imágenes representativas de cultivo de células MDCK cultivadas con (A) medio de cultivo, (B) inóculo estandarizado de virus de influenza A H1N1pdm09 neutralizado con una dilución de *pool* de sueros eficaz y (C) inóculo estandarizado de virus de influenza A H1N1pdm09 neutralizado con la dilución inmediata siguiente sin capacidad neutralizante.

8.3. “Biopanning” de biblioteca de péptidos aleatorios

Para aislar clonas de fagos identificadas por los anticuerpos presentes en los *pooles* de sueros de los animales vacunados en los diferentes grupos experimentales, se realizaron tres rondas de selección. Como control de calidad de enriquecimiento de las clonas durante las diferentes rondas de selección, se tituló la cantidad de fagos presentes posterior al paso de elución y después de la amplificación de los fagos recuperados (Figura 8). En todos los grupos experimentales, se observa un aumento en el título de fagos posteriores a la elución y también con respecto al título posterior a la amplificación en la primera y segunda rondas de selección.

8.4. Reactividad de clonas aleatorias de biblioteca de fagos seleccionadas contra *pooles* de sueros de los diferentes grupos vacunados

Una vez terminada la tercera ronda de selección de la biblioteca de fagos, se procedió a seleccionar 15 clonas de manera aleatoria de cada uno de los grupos experimentales y se determinó su reactividad contra el *pool* de sueros contra los cuales fueron seleccionadas. Se usó un *pool* de sueros de animales inoculados con SSI o con el adyuvante solo del grupo respectivo como control negativo de reactividad y de dicho control se determinó el promedio más tres veces la desviación estándar ($\bar{X} + 3 DE$) (que equivale al 99.7% de la población de negativos) para trazar una línea de corte de reactividad (Figura 9). Se consideraron positivas a las clonas que tuvieran una reactividad superior a la línea de corte y cuyo control negativo no reaccionara con dicha clona. Para el grupo 1 (VII), se detectaron 5 clonas reactivas (G1-2, G1-3, G1-4, G1-11 y G1-12); para el grupo 3 (VII+GK-1), 13 clonas fueron reactivas (G3-1, G3-2, G3-3, G3-4, G3-5, G3-6, G3-7, G3-8, G3-9, G3-12, G3-13, G3-14 Y G3-15); para el grupo 4 (VII+AIF), 4 clonas fueron reactivas (G4-3, G4-8, G4-14, G4-15); por último, para el grupo 6 [VII+Al(OH)₃], 3 clonas fueron positivas (G6-6, G6-7 y G6-10). Todas las clonas presuntamente positivas mencionadas anteriormente, fueron ensayadas nuevamente para corroborar su especificidad y descartar falsos positivos (Figura 10).

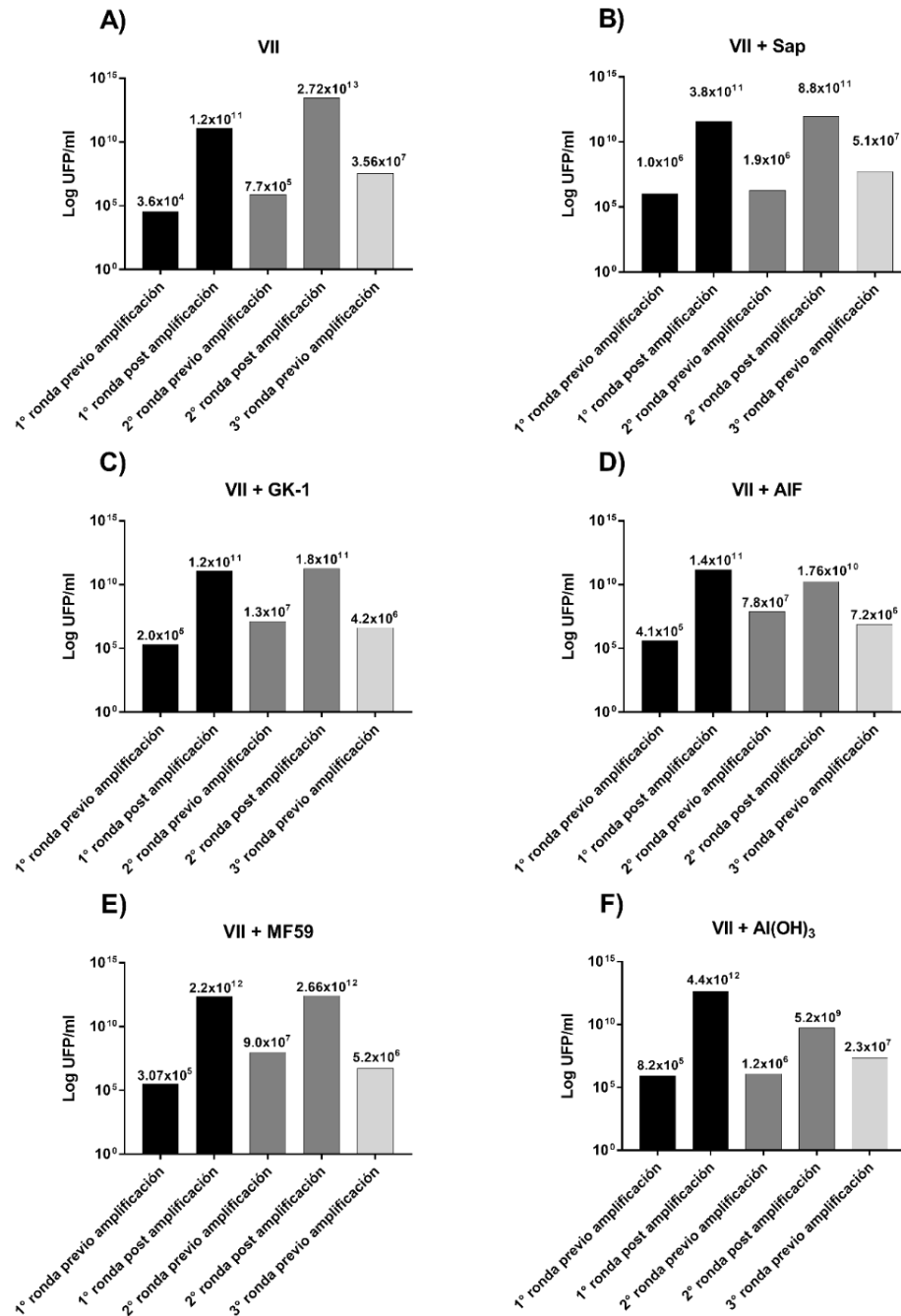


Figura 8. Título de bacteriófagos por ronda de selección de los diferentes grupos experimentales

Título de UFP/ml de bacteriófagos recuperados tras las rondas de selección o amplificación.

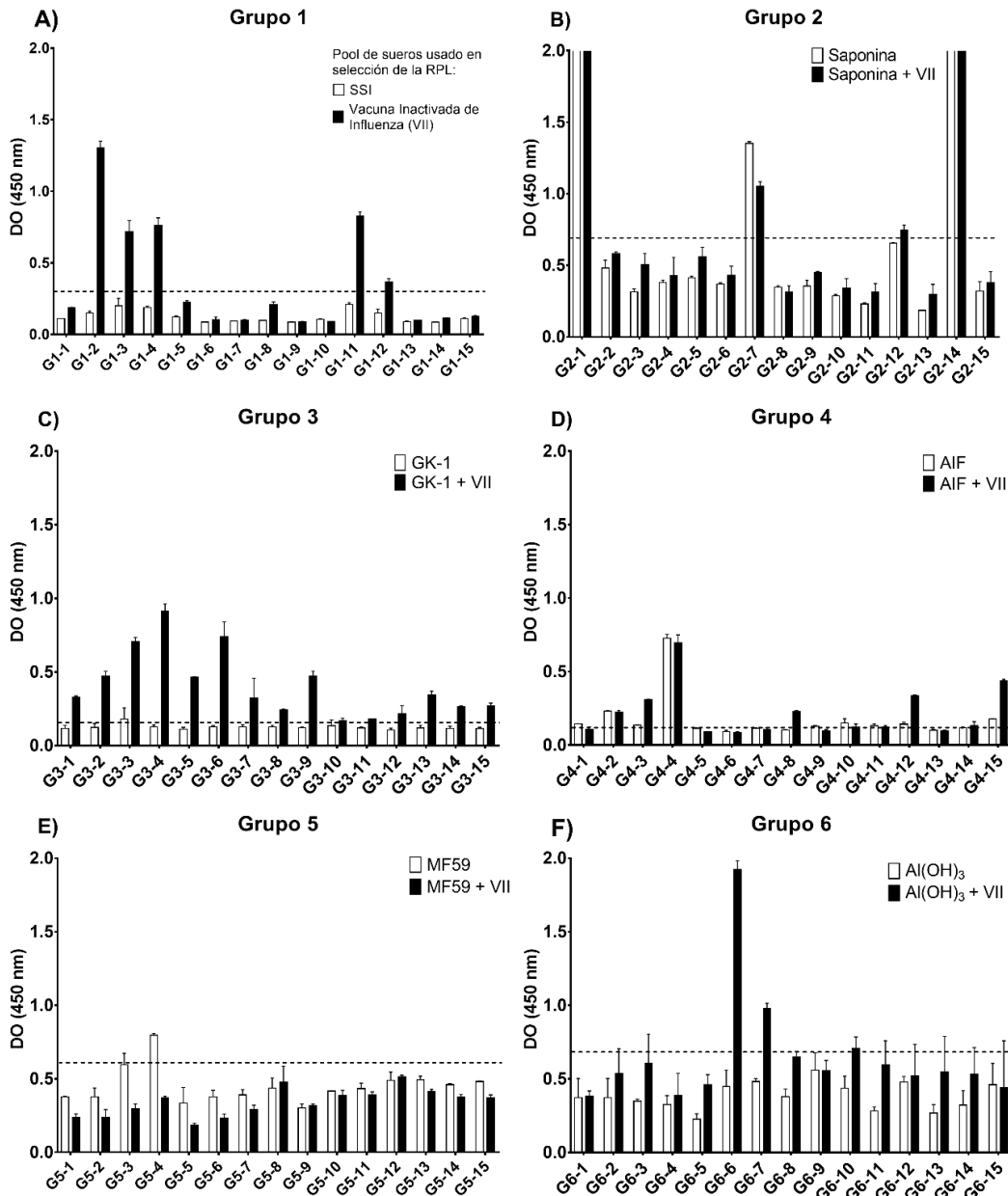


Figura 9. Reactividad de clonas aleatorias de fagos

ELISA de reactividad de clonas individuales por grupo experimental contra *pool* de sueros control y *pool* de sueros de los grupos experimentales de vacuna + adyuvante. La línea punteada representa el promedio + 3 DE de la señal los *pooles* de sueros negativos.

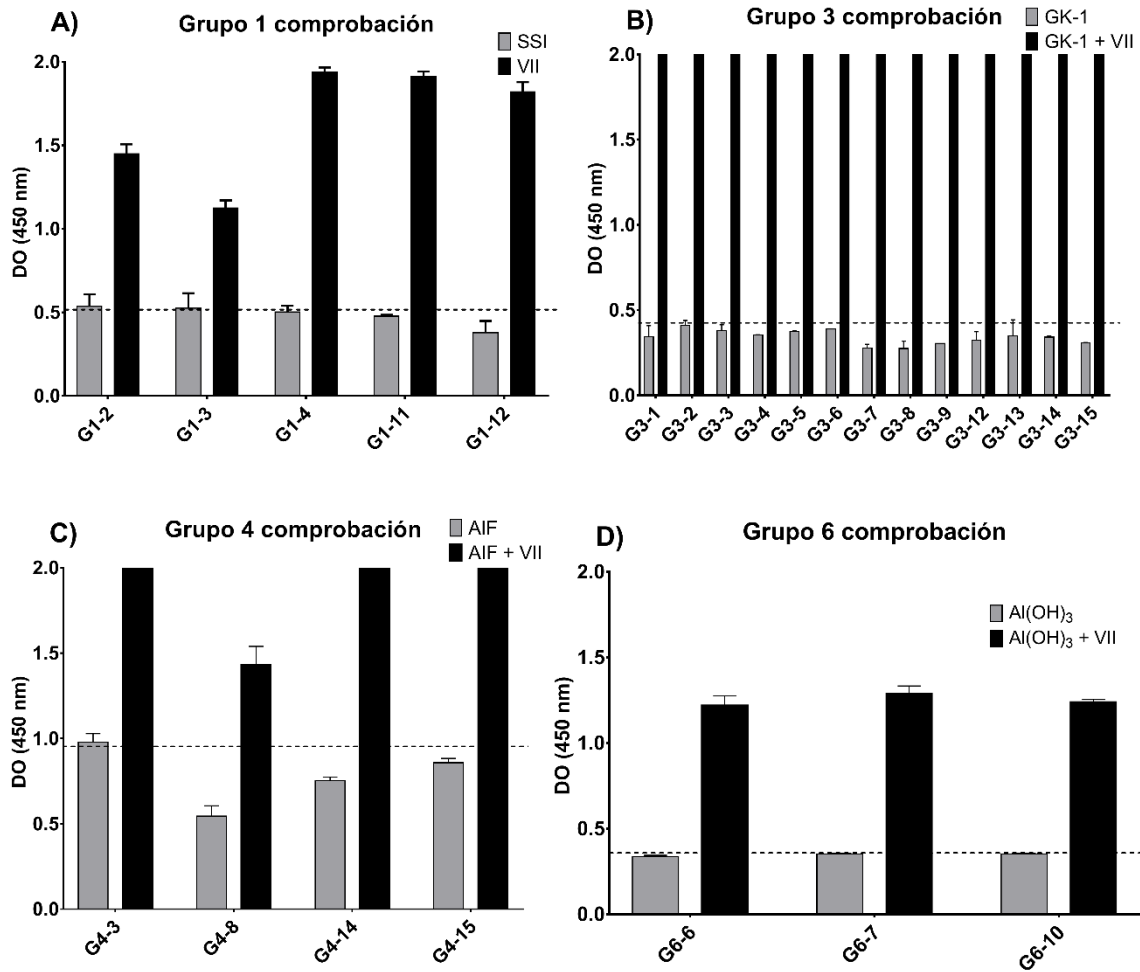
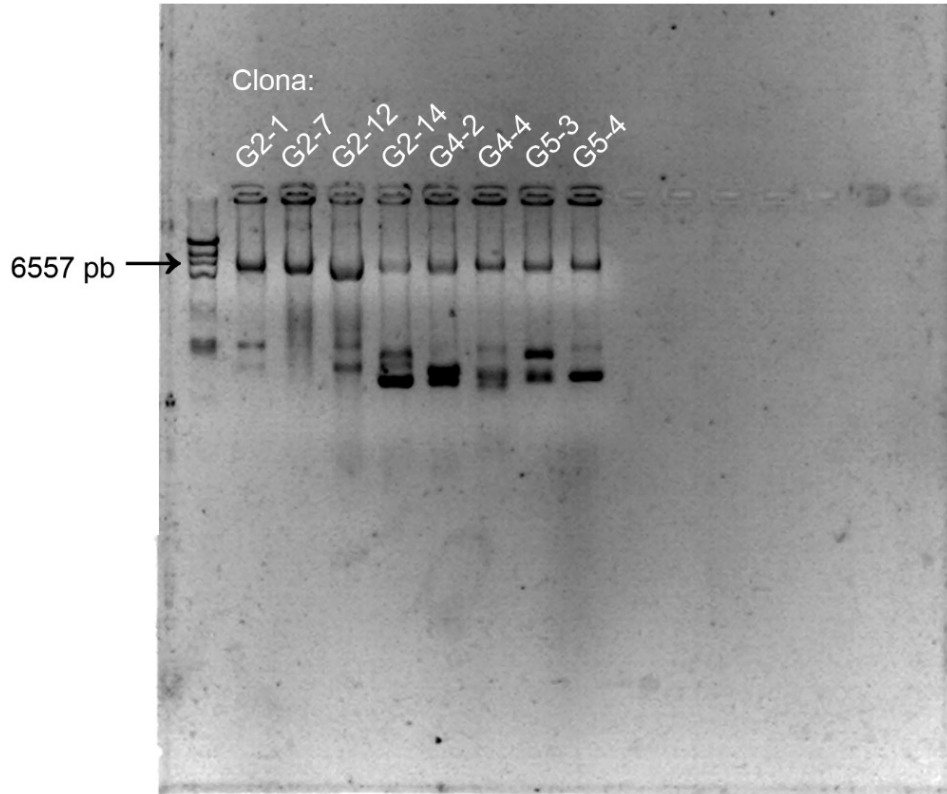


Figura 10. Comprobación de reactividad de clonas positivas

ELISA de comprobación de reactividad de las clonas presuntamente seleccionadas como positivas. La línea punteada representa el promedio + 3 DE de la señal del *pool* de sueros negativos.

8.5. Secuenciación de clonas reactivas

Todas las clonas de fagos de la tercera ronda de *biopanning* que fueron seleccionadas como positivas fueron propagadas, purificadas, se extrajo su ADNcs y se corroboró la calidad del mismo por medio de electroforesis en gel de agarosa 0.8%. Se muestra un gel representativo de los productos de extracción (Figura 11) donde la banda del ADNcs de los fagos se localiza en el peso molecular de ~ 6557 pb.



Exposure: 22 Frames 3.08 sec Gain: 3 ScanMode: Normal Brightness: 1 Date: 01/10/2018
Time: 14:21:30 File Name: Gel ADNcs 01 Oct 18 .tif

Figura 11. Electroforesis de ADN fágico de colonias positivas

Fotografía representativa de gel de agarosa 0.8% pre teñido con SYBR Green con una muestra representativa de productos de extracción de ADNcs de las clonas de bacteriófagos seleccionadas como positivas.

Grupo 1 [VII]			Grupo 4 [VII + AIF]		
Código de clona	Secuencia	Frecuencia de aislamiento	Código de clona	Secuencia	Frecuencia de aislamiento
G1-2	QPYWYPF	1/5	G4-3 & G4-8	VSMSHRA	2/4
G1-3	SELPLGY	1/5	G4-14	HSISHRA	1/4
G1-4	TANSPSH	1/5	G4-15	TTLSHRA	1/4
G1-11	HSLIYLH	1/5			
G1-12	LDFRPLY	1/5			
Grupo 3 [VII + GK-1]			Grupo 6 [VII + Al(OH) ₃]		
Código de clona	Secuencia	Frecuencia de aislamiento	Código de clona	Secuencia	Frecuencia de aislamiento
G3-1	ADARYKS	1/12	G6-6 & G6-10	LMRPSDR	2/3
G3-3 & G3-13	NQTAGHR	2/12	G6-7	GNSAWPP	1/3
G3-4	VGNLAFR	1/12			
G3-5	GSTSFSK	1/12			
G3-6	SVENSWN	1/12			
G3-7	NDYYFKP	1/12			
G3-8	SLQDDAY	1/12			
G3-9	STLTVTS	1/12			
G3-12	NTQVLNR	1/12			
G3-14	SSMPWDH	1/12			
G3-15	MPRLPPA	1/12			

Tabla 2. Secuencias de péptidos expresados en las clonas de fagos positivas

Secuencias de péptidos expresados y frecuencia de aislamiento para clonas individuales por grupo experimental.

Una vez purificado el ADNcs de las clonas de fago positivas, este se mandó a secuenciar al Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud del Instituto de Biología de la UNAM y se dedujo la secuencia del péptido expresado en cada una de las clonas, así como su frecuencia de aislamiento (Tabla 2).

En el caso de la clona G3-2, al determinar la secuencia de ADN del péptido expresado se encontró un codón de paro ignorado por *E. coli* en el cual se puede insertar un aminoácido aleatorio. Debido a la imposibilidad de determinar con certeza el aminoácido insertado por la bacteria en dicha posición, dicha clona fue descartada del resto del presente estudio.

8.6. Identificación de epítomos/mimotopos por bioinformática

Para todas las secuencias de péptidos anteriores, se realizó un alineamiento con la secuencia de hemaglutinina de la cepa de influenza A/California7/2009 (H1N1) pdm09, influenza A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) y cepa tipo B/Phuket/3073/2013 por medio de los algoritmos de Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). En ningún caso se encontró un alineamiento exitoso entre los péptidos expresados en los fagos seleccionados por el *biopanning* y las secuencias de hemaglutinina de las cepas presentes en la vacuna (datos no mostrados). Para determinar la localización espacial de los mimotopos expresados en los fagos dentro de la HA, se compararon estos con los cristales de dicha proteína reportados en la PDB. Los cristales usados como modelo de comparación fueron 3M6S para influenza A H1N1 pdm09, 6PDX para Influenza A H3N2 y 4FQM para influenza B. Las secuencias de péptidos de las clonas de fago fueron sometidas a análisis en el servidor Episearch (<http://curie.utmb.edu/episearch.html>) y posterior a la depuración de los resultados del servidor para obtener el mimotopo más probable, se localizaron juntos todos dentro del cristal de HA para influenza A H1N1 pdm09, Influenza A H3N2 e influenza B 2013, respectivamente, para cada uno de los grupos experimentales (Figura 12 A y B).

Figura 12 A. Localización de mimotopos en estructura tridimensional de HA

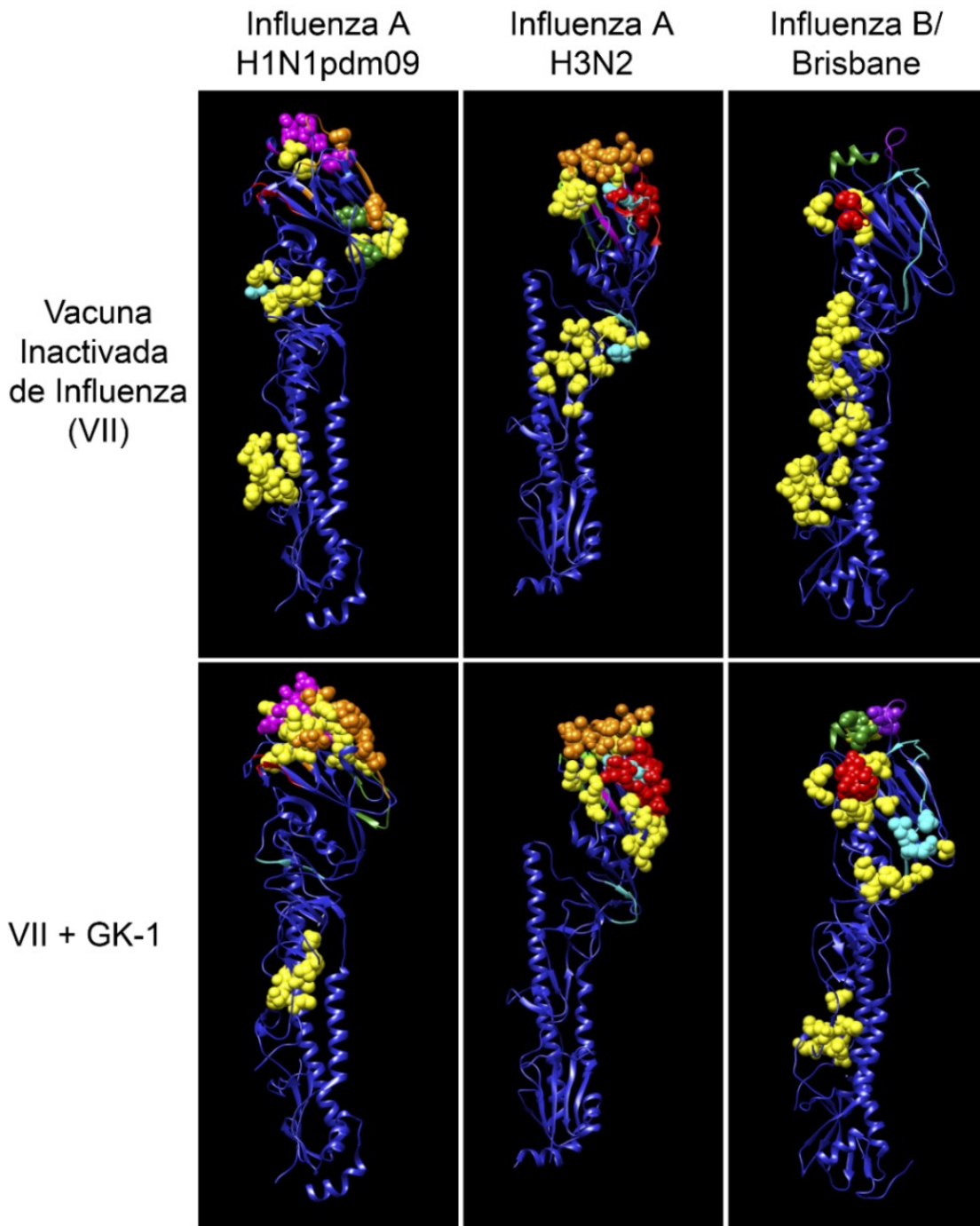


Figura 12 A (pie de figura). Localización de mimotopos en estructura tridimensional de HA

Imagen tridimensional de localización de los mimotopos reconocidos dentro de hemaglutinina (HA) de influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2 o Influenza B para los grupos experimentales de VII y VII+GK-1. La totalidad de los mimotopos identificados por EpiSearch fueron superpuestos en los cristales de las cepas de influenza respectivos. En amarillo se muestran los aminoácidos identificados que no pertenecen a ninguno de los sitios antigénicos de HA mientras que los demás colores representan aminoácidos que caen dentro de los sitios antigénicos.

Código de colores de sitios antigénicos:

Influenza A H1N1 pdm09: Sa (anaranjado), Sb (magenta), Ca1 (verde), Ca2 (Rojo), Cb (cian).

Influenza A H3N2: Sitio A (rojo), Sitio B (anaranjado), Sitio C (cian), Sitio D (verde), Sitio E (morado).

Influenza B: 120-loop (cian), 150-loop (rojo), 160-loop (morado), 190-loop (verde).

Figura 13. Localización de mimotopos en estructura tridimensional de HA

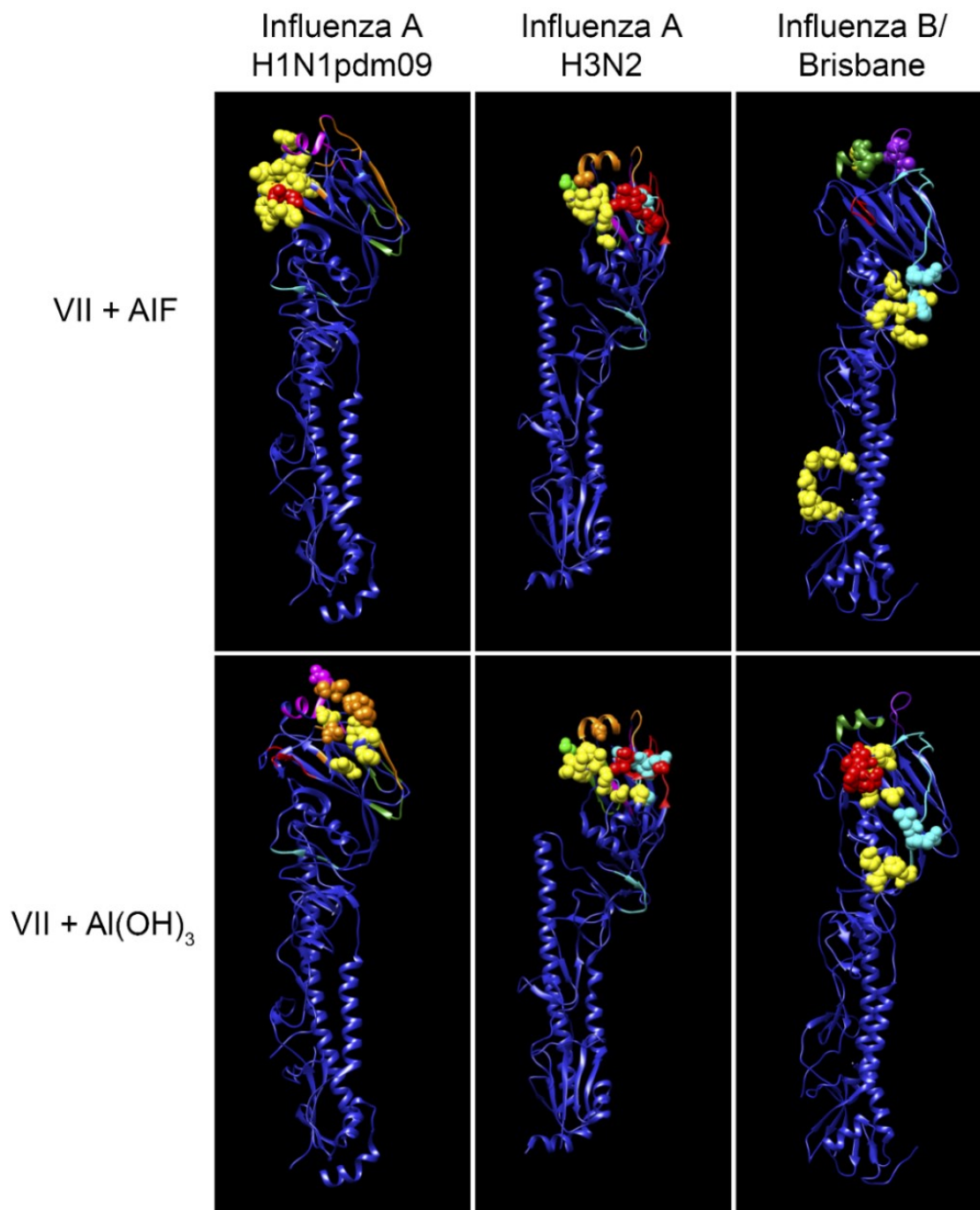


Figura 12 B (pie de figura). Localización de mimotopos en estructura tridimensional de HA

Imagen tridimensional de localización de los mimotopos reconocidos dentro de hemaglutinina (HA) de influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2 o Influenza B para los grupos experimentales de VII y VII+GK-1. La totalidad de los mimotopos identificados por EpiSearch fueron superpuestos en los cristales de las cepas de influenza respectivos. En amarillo se muestran los aminoácidos identificados que no pertenecen a ninguno de los sitios antigénicos de HA mientras que los demás colores representan aminoácidos que caen dentro de los sitios antigénicos.

Código de colores de sitios antigénicos:

Influenza A H1N1 pdm09: Sa (anaranjado), Sb (magenta), Ca1 (verde), Ca2 (Rojo), Cb (cian).

Influenza A H3N2: Sitio A (rojo), Sitio B (anaranjado), Sitio C (cian), Sitio D (verde), Sitio E (morado).

Influenza B: 120-loop (cian), 150-loop (rojo), 160-loop (morado), 190-loop (verde).

Para cada clona de fago analizada, se alinearon entre sí las soluciones de influenza A H1N1 pdm09, Influenza A H3N2 e influenza B arrojadas por el servidor EpiSearch para determinar aminoácidos conservados o de propiedades químicas similares entre las tres cepas de influenza. Los resultados de dicho alineamiento se muestran a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3. Alineamientos de las soluciones del servidor para ambas cepas de influenza

Alineamiento de secuencias de mimotopos identificados en la estructura terciaria de influenza A H1N1 pdm09, Influenza A H3N2 e influenza B arrojadas por el servidor Episearch. Los aminoácidos resaltados en negro representan aminoácidos que se alinean con una o las dos soluciones de las hemaglutininas de las otras cepas.

Secuencia de péptido en fago	Cepa de influenza	Mimotopo reconocido dentro de la estructura terciaria de la hemaglutinina
Grupo 1. VII		
QPYWYPF	A/H1N1	P159, Q189, Q193, Y198, P212
	A/H3N2	F125, W127, Q132 , W153, Y161, P162 , Q197
	B	P31, P305, Y306, W321, P325
SELPLGY	A/H1N1	Y165, E172, S204, Y206, L233, E235, P236, G237
	A/H3N2	S47, G49 , E50, S54, P55, G275 , S279, E280, P289, Y302, G303
	B	P70, S140, G141 , P144, G149, G151, G235, G236, L237
TANSPSH	A/H1N1	H8, A9, N10, N11, S12 , T13, T15, T25, H28, S29, N320 , P322
	A/H3N2	T40 , N45, S46 , S47, S279, N285 , P289, N290 , P293, N296, N298, T301 , S312, T313
	B	T8, S9, S10 , N11, S12, P13, H14, N25, T27, A329, N330, T332
HSLIYLH	A/H1N1	L50, H51, S83, S84, S85 , I265, I267 , S268
	A/H3N2	S136, H156, L157, S159 , Y161, H184, I192 , L194, S198, I217
	B	S39, H40, L44 , H85, S283 , L284, L286, I287, Y297, L300
LDFRPLY	A/H1N1	P159, L191, D196, Y198, P212
	A/H3N2	D188, D190, F193, L194, R220, P221 , R222, D225 , P227, R229
	B	P31, L32, P36, L300 , P305, Y306, P325

Grupo 3. VII + GK-1		
ADARYKS	A/H1N1	K153, S157 , K160 , A195, D196 , Y198
	A/H3N2	S95, Y100, S136, S137, S138, R140, R141, S145 , S146, R222, R224, D225 , R229
	B	K164, A166, A199, K200, D204 , S205 , K206
NQTAGHR	A/H1N1	N125 , G155, N156, Q189, Q193 , N194 , A195, T245
	A/H3N2	N126 , A128, G129 , T131 , Q132 , N133 , G134, T155 , H156, N158, A163, A196, Q197, T248
	B	R69, G138 , T139 , G141, N145 , T147, N148, G149, N150, G151, A154
VGNLAFR	A/H1N1	K160, S162, K163, S164, F200 , K209, T241, T245
	A/H3N2	F125, N126 , A128, G129 , V130, N133 , G134 , L157, N158, A163, L194 , A196
	B	N145 , N148, G149 , ----- N150 , G151 , F152 , G235, G236, L237
GSTSFSK	A/H1N1	K160, S162 , K163, S164 , F200, K209 , T241, T245
	A/H3N2	T131, G13, T13, S13 , T15, S15 , T18, K18 , F193, S198
	B	S140, N145, N148, N150, W158
SVENSWN	A/H1N1	S128, N129 , V132, W150 , V152, S190 S140, N145, N148, N150, W158
	A/H3N2	N121, N122, E123, S124, N126 , W127 , N165, N171, E172, S205
	B	S140, N145, N148 , N150 , W158
NDYYFKP	A/H1N1	N125, D127, K130, K153 , K154 , N156 , P159, N194
	A/H3N2	F79, N81, K82 , K83 , F120, N121 , N122 , F174, Y257
	B	P70, K71 , P144, N145 , N148 , N150 , 152
SLQDDAY	A/H1N1	S185 , A186, D187 , Q189 , S190, L191 , Q193 , A195
	A/H3N2	S159 , Y161, D188 , D190 , L194, A196, Q197 , S198 , S199
	B	A166, Q197 , A199, L201 , D204 , S205

STLTVTS	A/H1N1	S128, V132, T133, V152, L191
	A/H3N2	V130, T131, T135, S136, T155, L157, S159, V186, T187, L194, S198
	B	S78, L19, T121, T179, S274
NTQVLNR	A/H1N1	N125, V152, N156, Q189, L191, Q193, N194
	A/H3N2	N126, V130, T131, Q132, N133, T155, L157, N158, L194, Q197, T248
	B	V15, V16, T18, Q21, V24, N25, V29, L326, L328, N330
SSMPWDH	A/H1N1	W123, P124, D127, S128, S157, P159
	A/H3N2	P74 , D77, S136, S137, S138, S143, S145, S146, S149, W153
	B	W158 P70 , S140, P144,
MPRLPPA	A/H1N1	L32, L290, P291, P304, L312, R313, L314
	A/H3N2	A128, L157, P162, A163, L194, A196, R201
	B	R50, P55, P77, R118, L119
Grupo 4. VII + AIF		
VSM SHRA	A/H1N1	V132, A134, H138, A139, A141, S143, R221
	A/H3N2	S136, S137, S138, S145, H184, V186, S219, R220, R222, R224, R229
	B	S9, S10, S12, H14, V29, A329, R335
HSISHRA	A/H1N1	H181, S183, S185, A186, I214, A215, I216, R217, R226
	A/H3N2	S136, S137, S138, S145, H184, S219, R220, R222, I223, R224, I226, R229
	B	R50, I76, S78, R80, H116, R118, S274
TTL SHRA	A/H1N1	T133, A134, H138, A139, A141, S143, R221
	A/H3N2	S95, T135, S136, S137, S138, R140, R141, S145, S146, R222, R224, R229

	B	T165, A166, T167, A199, L201, S205
Grupo 6. VII + Al(OH)₃		
LMRPSDR	A/H1N1	P118, S121, P124, D127, S128, R252
	A/H3N2	S136, S137, S138, S145, D190, S219, R220, P221, R222, R224, D225, P227, R229
	B	R50, P55, P77, S78, R118, L119
GNSAWPP	A/H1N1	W123, P124, N125, S128, G155, N156, S157, P159
	A/H3N2	P74, N96, N133, G134, S136, S137, S138, G142, S143, N144, S145, S146, S149, W153
	B	P70, G138, S140, G141, P144, N145, N148, G149, N150, G151, A154, W158

9. Discusión

El objetivo del presente proyecto fue el determinar el efecto de los adyuvantes en la respuesta inmune humoral de ratones tras la coadministración de estos con la vacuna trivalente inactivada anti influenza (VII).

Para este estudio seleccionamos un conjunto de adyuvantes entre los cuales figuran los más utilizados con fines experimentales, como saponina (Sap) y Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) y el hidróxido de aluminio $[Al(OH)_3]$ que es el adyuvante más ampliamente usado para vacunación en humanos. Así mismo, incluimos el adyuvante AddaVax, que es un análogo comercial del MF59, el cual es un adyuvante que ha sido recientemente aprobado por la Food and Drug Administration (FDA) en los Estados Unidos de Norteamérica para su uso como adyuvante en adultos mayores de 65 años para la vacuna triple inactivada de influenza FLUAD® en abril de 2019 (<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/flud>)¹. Incluimos además el péptido GK-1 propuesto por nuestro laboratorio que ha demostrado potenciar la capacidad protectora de vacuna de influenza humana y demostrado inocuidad en los ensayos pre-clínicos realizados por un tercero autorizado (45, 46).

El AIF fue el adyuvante que indujo el mayor título de anticuerpos IgG1, IgG2b e IgG2a. AddaVax y $Al(OH)_3$ fueron los siguientes dos adyuvantes que indujeron primordialmente IgG2a y en menor medida IgG1 e IgG2b (Tabla 1).

Es ampliamente reportado en la literatura que en modelos murinos, el aumento en la producción de IgG1 se relaciona con una respuesta inmune del tipo 2 (Th2), mientras que el aumento en la producción de IgG2a, se relaciona más con una respuesta inmune de tipo 1 (Th1) (61, 62). Para que se lleve a cabo una polarización hacia Th2, es necesaria la secreción de grandes cantidades de IL-4 y bajos niveles de IFN- γ , mientras que para la polarización de la respuesta inmune hacia Th1, se producen grandes cantidades de IFN- γ y bajas concentraciones de IL-4. En este trabajo obtenemos evidencias que señalan que diferentes adyuvantes pueden polarizar diferencialmente la respuesta Th1/Th2. Nuestros resultados indican que el AIF y $Al(OH)_3$ polarizan la respuesta inmune hacia una respuesta de tipo Th2, mientras que AddaVax polariza principalmente hacia una respuesta una respuesta de tipo Th2/Th1. Es posible que estas

¹ Recuperado 4 de septiembre de 2019.

diferencias resulten de una modulación diferencial por los distintos adyuvantes del ambiente de citocinas inducido.

Analizando los adyuvantes empleados, el hidróxido de aluminio es un adyuvante que se ha empleado en la formulación de vacunas humanas por casi un siglo para potenciar la respuesta de anticuerpos. Se ha reportado que este adyuvante promueve una respuesta de tipo Th2 y una pobre respuesta de tipo Th1 (63). En este trabajo, encontramos que el hidróxido de aluminio induce altos títulos de IgG1 compatibles con una respuesta inmune de tipo Th2 conforme a lo reportado. Se ha demostrado que este adyuvante activa al inflammasoma NLRP3 de células presentadoras de antígeno independiente de Myd88 y aunque se desconocen los detalles de cómo se activan al inicio los linfocito expuestos a una vacuna con $\text{Al}(\text{OH})_3$, se propone que este adyuvante favorece inicialmente la secreción local de IL-1 β , IL-18 y/o IL-33, que eventualmente tiene un efecto en el aumento de IL-4 y reducen la producción de IFN- γ , polarizando así la respuesta primordialmente hacia tipo Th2 (26, 64).

Para el caso del AIF, se ha reportado que su adición a un antígeno como ovoalbúmina, aumenta la producción de IL-4 (36). En el caso de inoculación del AIF con colágeno en ratones, por medio de RT-PCR se ha detectado la expresión de IL-2 compatible con una respuesta Th2 (36) así como una liberación mayor de DAMPS que promueven también una respuesta de tipo Th1. Estas observaciones resultan en la inducción de una respuesta Th1/Th2 promovida por el AIF como la que se observa en el estudio de Billiau *et al* (36).

Discutiendo más a fondo el adyuvante AddaVax (análogo comercial de uso veterinario del MF59), se ha reportado en la literatura para el MF59 que es capaz de encender un gran número de genes en células mononucleares periféricas sanguíneas (PBMC por sus siglas en inglés) en el sitio de inoculación, varios de ellos específicos a este adyuvante en particular en comparación con los genes inducidos por otros adyuvantes como CpG y $\text{Al}(\text{OH})_3$. Entre los genes activados, se encuentran varios pertenecientes a la respuesta inflamatoria, síntesis de prostaglandinas, de IL-1, de sus mecanismos de señalización, de metaloproteinasas de matriz (MPP por sus siglas en inglés) así como moléculas relacionadas con el reclutamiento y migración de leucocitos y secreción y señalización de interferones de tipo I (30, 65). Esto resulta compatible con lo que observamos en este proyecto ya que que Adavax, promovió un fenotipo

parte Th1 por la gran cantidad de anticuerpos IgG2a, y en menor medida, un fenotipo Th2 por la presencia de anticuerpos IgG1 (Tabla 1).

En el caso de las saponinas y de compuestos derivados de estas, se ha publicado que el que posean un grupo carbonilo capaz de formar un enlace tipo imina con la célula blanco a activar, es esencial para su capacidad adyuvante(44). La primera célula donde actúan este tipo de adyuvantes es en los linfocitos T donde inicialmente, por la formación del enlace tipo imina con algún receptor de membrana del linfocito (el cuál se piensa puede ser CD2), las saponinas activan cascadas de señalización intracelular las cuales sustituyen a las señales de coestimulación (como la de CD28 siendo señalizada por CD80) esenciales para su activación. Luego, por reconocimiento del antígeno de la célula presentadora de antígeno, esto conlleva a la activación del linfocito T con la producción de IL-2 y polarización (por lo menos parcialmente) hacia una respuesta de tipo Th1. El segundo blanco donde actúan las saponinas es en la célula presentadora de antígeno. En estas células. Tanto los antígenos como las saponinas son fagocitados y una vez dentro de la célula presentadora de antígenos, se piensa que las saponinas desestabilizan la membrana del fagosoma ocasionando la liberación del antígeno al citoplasma. Acto seguido, este es procesado por medio del proteasoma y es presentado en moléculas de tipo MHC I a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes para su eventual maduración a linfocitos T citotóxicos así como a linfocitos T CD4⁺(29, 44). Se reporta en la literatura que las saponina no polarizan primordialmente hacia ninguno de los dos tipos de respuesta inmune (29); sin embargo, para nuestro modelo experimental, observamos una mayor polarización hacia Th2 esto observado por una mayor producción de Ig1. Debido a que no se aislaron clonas específicas en la selección de fagos para este grupo experimental, no es posible concluir si tiene o no efecto en el repertorio de epítomos reconocidos por los anticuerpos generados o, en dado caso, para nuestro modelo experimental de una sola dosis de vacuna de influenza en ratones por lo que es necesario repetir los experimentos de este grupo experimental en futuros abordajes de este proyecto.

Para el caso de GK-1, en nuestro grupo de trabajo hemos demostrado que promueve particularmente la capacidad protectora ante el desafío con virus de influenza, tanto en ratones como en cerdos (45, 46). Este aumento en la capacidad protectora es resultado de una activación más efectiva de células presentadoras de antígeno que se traducen en una respuesta celular protectora más efectiva y en una respuesta humoral polarizada hacia un fenotipo Th2 (66).

Hablando acerca de la capacidad de neutralización del virus de la influenza A H1N1 pdm09 en los cultivos celulares de MDCK2, se observa que VII+Sap fue el grupo que tuvo niveles de microneutralización más elevados de todos (1:3,200) seguido por VII+GK1 y VII+AddaVax (1:1,600). Esto indica que los niveles de anticuerpos inducidos no correlacionan directamente con su eficiencia para neutralizar al virus y no necesariamente reflejan una medida exacta de su capacidad protectora a pesar de ser la lógica con la cual se evalúa la eficacia en la protección contra un patógeno en muchas ocasiones. Tal es el caso con el VII+AIF el cual tuvo títulos elevados de anticuerpos anti-VII para IgG1, IgG2a e IgG2b, pero su capacidad de microneutralización contra el virus de influenza A H1N1 fue muy baja, indicando que los anticuerpos producidos no son tan eficientes neutralizando al virus a pesar de producirse en grandes cantidades. Estos resultados indican que es posible que la capacidad protectora esté más relacionada con el repertorio de epítomos reconocidos que por la cantidad de anticuerpos.

Considerando estas observaciones, resulta de particular relevancia los resultados obtenidos al respecto del efecto de los adyuvantes en la especificidad de la respuesta inducida; aspecto muy poco explorado, cabe mencionar. Khurana y colaboradores han demostrado que al inocular la vacuna comercial contra la influenza sola o adicionada con el adyuvante hidróxido de aluminio o el MF59, se aíslan clones de fagos que expresan péptidos de la hemaglutinina de influenza con patrones diferentes de localización dentro de la secuencia de esta proteína. Mientras que los sueros de los pacientes vacunados con la vacuna sola reconocen más la región de HA2 de hemaglutinina (esto medido por una biblioteca de fagos de la secuencia de HA1 y HA2 de hemaglutinina de influenza). Los sueros de los pacientes vacunados que además recibieron el adyuvante MF59, reconocían con mayor selectividad la región de la cabeza globular (HA1) así como un aumento de hasta 20 veces en la avidéz de los anticuerpos producidos por pacientes con la vacuna adicionada con adyuvante (esto último medido por medio de resonancia de plasmones) (67, 68). Para el caso del Maeda *et al*, se observó una mayor especificidad de epítomos reconocidos por anticuerpos generados contra el dominio III de la glicoproteína de envoltura del virus del dengue al vacunar ratones con este antígeno y la toxina termolábil o la subunidad B no tóxica como adyuvantes; obteniendo resultados similares a los de Khurana *et al* y teniendo anticuerpos con una mayor capacidad de neutralización de la infección contra el virus al usar las moléculas con capacidad adyuvante junto con el antígeno (67-71).

En este trabajo se decidió estudiar la especificidad evaluando el repertorio de epítomos/mimotopos reconocidos por los sueros provenientes de los ratones inmunizados con la VII sola y con los diferentes adyuvantes evaluados en una biblioteca de fagos de péptidos de 7 aminoácidos de largo. Esta estrategia nos permitió identificar un conjunto de mimotopos que fueron reconocidos por los anticuerpos inducidos por la VII sola y con los diferentes adyuvantes. Adicionalmente, el grupo de VII+GK-1 que indujo muy bajos títulos de anticuerpos y presentó altos títulos de microneutralización, reconoce un conjunto amplio de mimotopos que, conforme a nuestro análisis predictivo de localización de epítomos, pertenecen a la cabeza globular e incluyen múltiples aminoácidos pertenecientes a los sitios antigénicos, que se ha reportado ampliamente como sitios susceptibles a neutralización por anticuerpos para prevención de la infección celular. Estas posiciones por la misma presión de selección, son los amino ácidos más susceptibles a mutar para evadir la respuesta inmune. Esto implica que, el uso del adyuvante GK-1 indujo anticuerpos neutralizantes contra el virus de influenza H1N1 haciendo a la vacuna más eficaz independientemente de las cantidades de anticuerpo inducidas.

También en el caso del uso de $\text{Al}(\text{OH})_3$ como adyuvante de la VII se observó que concentra la respuesta inmune humoral hacia sitios antigénicos que son críticos para la neutralización de la HA, esto medido por la identificación espacial dentro de la HA de los mimotopos. Esto coincide con la alta capacidad neutralizante de los anticuerpos inducidos cuando la vacuna se formula con $\text{Al}(\text{OH})_3$.

El hecho de la posible modificación de los epítomos reconocidos por los anticuerpos generados tras la vacunación de un antígeno en función de los adyuvantes con los cuales es adicionada esta vacuna, abre una ventana con un gran potencial para el diseño racional de vacunas lo que amerita consolidar estos conocimientos evaluando diferentes aspectos, de los cuales, surgen diferentes preguntas como: ¿Bajo qué condiciones se modifica el repertorio de anticuerpos por los adyuvantes? ¿Cuáles adyuvantes presentan dicho efecto y en qué medida? ¿Este fenómeno es extrapolable a otras especies animales? ¿Es posible extrapolar este fenómeno a otros antígenos?

Al respecto de la metodología empleada para el estudio de los repertorios de epítomos/mimotopos reconocidos cabe mencionar algunas consideraciones. Durante el proceso de captura de los fagos de la biblioteca comercial por los anticuerpos adsorbidos en la placa de

ELISA, proceso referido como “biopanning”, se realizó bajo el mismo criterio para todos los grupos experimentales; es decir, mismas condiciones de aislamiento, mismo número de rondas de selección y mismo número de colonias “picadas” aleatoriamente y amplificadas, previo al análisis de reactividad por ELISA una vez realizada la tercera ronda de selección. La justificación detrás de ello es que consideramos que al seleccionar las clonas bajo las mismas condiciones experimentales, la probabilidad de capturar fagos afines a los anticuerpos del grupo experimental respectivo, es la misma entre todos los grupos experimentales haciendo representativa la población de fagos capturados y analizados.

En la gran mayoría de los grupos experimentales, el título de los fagos fue en aumento conforme se avanzó en las rondas de selección. Esto indica el aumento por lo menos en números de la población de fagos y teóricamente el enriquecimiento de poblaciones de fagos de mayor afinidad hacia los anticuerpos en la placa.

Es importante mencionar que conforme a lo ampliamente reportado en la literatura, solamente se realizaron tres rondas de selección para las clonas ya que más de cuatro rondas de selección conllevan al aislamiento de clonas de fagos inespecíficas (también llamadas secuencias parásitos), aumentando las probabilidades de tener aislamientos falsos positivos (34, 72).

Algo que notamos durante el procedimiento de *biopanning*, fue que ninguna de las clonas de fagos seleccionadas, contenía secuencias de los péptidos expresados que fueran idénticas a la de hemaglutinina por lo que los denominamos “mimotopos”, debido a que son similares a la estructura de la hemaglutinina de influenza. Estos mimotopos aislados, pueden ser de tipo lineales o conformacionales; dicho de otra manera, algunas de estas estructuras tridimensionales de los péptidos expresados en los bacteriófagos que se aislaron, se asemejan ya sea por aminoácidos continuos o por una estructura tridimensional que, a final de cuentas, por los aminoácidos que contiene, tiene propiedades de unión similares a antígenos de hemaglutinina a los que representan, permitiéndoles ser capturados por el anticuerpo de manera similar a como lo haría el antígeno de secuencia original de influenza.

Aunque un procedimiento cuidadoso y exitoso de *biopanning* es confiable con respecto a la similitud de los mimotopos capturados con respecto a la proteína con la cual se compara, una manera que no se ensayó pero a futuro permitiría corroborar si los mimotopos lineales

aislados son en efecto similares en su capacidad de ser reconocidos por los anticuerpos contra la hemaglutinina, sería haciendo experimentos de competencia entre los péptidos sintéticos de influenza de la región donde el mimotopo la reconoce contra cada mimotopo de los bacteriófagos aislados. En el caso de los mimotopos conformacionales, podría hacerse ensayos de competencia contra la cabeza globular trimétrica de hemaglutinina en condiciones nativas para corroborar la afinidad de los mimotopos por los anticuerpos generados.

Habiendo aislado y amplificado las clonas de fagos a probar por medio de ELISA contra los *pooles* de sueros respectivos con los cuales fueron seleccionados, se estableció la línea de corte del promedio más tres desviaciones estándar ($\bar{X} + 3 DE$) del control negativo, ya que esta comprende estadísticamente el 99.7% de dicha población (73). Así mismo, se estableció el segundo criterio de inclusión que comprendía la no reactividad de la clona contra el suero negativo. Como se puede observar, p. ej. en la clona G2-7 o G4-4, las clonas reaccionan tanto contra el suero de animales vacunados como contra el suero de animales no vacunados. La posible explicación a esto consiste en que, debido a que la clona expresa péptidos aleatorios, pudiera ser que el péptido presentado en el fago tuviera similitud espacial con el antígeno de un “anticuerpo natural” del ratón (IgM no mutada en las regiones VDJ) (74, 75) o también llamados “autoanticuerpos”. Al respecto de autoanticuerpos, se ha reportado la presencia de estos en gran número de animales sin que esto represente *per se* una autoinmunidad. Debido a que en el caso de la reactividad de dichas clonas tanto con el *pool* de sueros negativo como con el *pool* de los animales vacunados solamente indicaría un epítipo que es reconocido en condiciones ajenas a la vacunación contra influenza; dichas clonas fueron descartadas para el resto del estudio. Es importante mencionar que para corroborar que todas las clonas seleccionadas tentativamente como positivas en verdad lo fueran, estas se ensayaron nuevamente contra los sueros respectivos con el mismo rigor mencionado anteriormente confirmándose que cada una de las clonas de fago aisladas como positivas por su reactividad contra el suero, en verdad lo fueran, descartando así falsos positivos. Un segundo control que se realizó fue que todos los *pooles* de suero de todos los grupos experimentales, se analizaron en su reactividad contra las clonas de fagos seleccionadas en el grupo de VII sola y todos estos *pooles* de sueros dieron una fuerte señal en contra de las clonas del grupo de VII. Esto corrobora que a pesar de que se hubieran seleccionado diferentes clonas de fagos con diferentes secuencias de péptidos aleatorios en los grupos de vacuna + adyuvante, todos estos sueros reconocen

también los epítomos de hemaglutinina que la los anticuerpos presentes en el grupo de VII sola (datos no mostrados).

Habiendo seleccionado las clonas de fagos positivas para cada grupo experimental, se extrajo el ADNcs y se determinó su calidad por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.8%. En la Figura 11 se observa una fotografía representativa de un gel de agarosa con algunos productos de extracción de ADNcs de algunas clonas y se indica la banda del producto de extracción del material genético del fago en el peso molecular correspondiente. En pesos moleculares menores se observa la presencia de bandas posiblemente de plásmidos extraídos durante el proceso.

En este punto es importante mencionar que se observó en los geles de algunos de los productos de extracción de ADNcs la presencia de barridos amplios o bandas muy grandes en muy bajos pesos moleculares, indicando contaminación de algún tipo en el material genético aislado. Así mismo, al analizar por espectrofotometría en NanoDrop 2000 el material genético aislado, con frecuencia la cantidad de ADNcs o su calidad fueron inadecuados (basado en los valores de relación de absorbancia de $260\text{ nm}/280\text{ nm} = 1.8$ y $260\text{ nm}/230\text{ nm} = 2.0 - 2.2$), por lo que una banda de extracción de ADNcs sumamente limpia y valores iguales o lo más cercanos posibles en los cocientes de absorbancias mencionadas son críticos para obtener el electroferograma con la secuencia del fago, por lo que se sugiere especial cuidado en cumplir dichos criterios.

Una vez secuenciadas todas las clonas positivas, se alinearon por medio del algoritmo de Clustal Omega y se observó que solamente en el grupo 4 (VII+AIF) todas las clonas presentaron el motivo conservado “---SHRA” y dos aminoácidos altamente conservados por propiedades químicas S/T y M/I/L (Tabla 3). En ninguno de los otros grupos experimentales se observó un motivo conservado entre las clonas. Así mismo, tampoco hubo alineamiento exitoso entre ninguna de las secuencias de las clonas de grupo 3 (VII+GK-1) y el propio GK-1 por lo que no se tratan de anticuerpos dirigidos contra el péptido. Por último, es interesante mencionar que al hacer alineamientos entre la solución arrojada por el servidor Episearch para las cepas de influenza presentes en la vacuna, salvo el par de soluciones para el péptido de la clona G3-14, en todas las demás soluciones se observan múltiples aminoácidos que coinciden entre sí. Esto sugiere que el anticuerpo del ratón que se generó por la vacunación con VII más el

adyuvante respectivo, seleccionó la clona del fago y dicho anticuerpo está reconociendo una estructura tridimensional para ambas cepas (influenza A e influenza B propias de la vacuna utilizada en nuestro modelo experimental). Posiblemente las propiedades espaciales del mimotopo de cada clona para ambas cepas seleccionados en el *biopanning* son similares entre sí e hipotéticamente, también las propiedades de adhesión de los antígenos hacia los anticuerpos generados por la vacunación de los animales. Si esto fuera cierto, podría sugerir una protección cruzada entre las cepas de influenza A e influenza B utilizadas en el modelo experimental. Si bien esto requiere estudios mucho más profundos, ello abre otra importante ventana de investigación en este aspecto para determinar si es posible inducir protección cruzada contra varios tipos o cepas de influenza por medio de la vacunación, junto con adyuvantes como GK-1, dirigida a las regiones neutralizantes de la hemaglutinina de influenza. En caso de inducirse una protección cruzada por la vacunación conjunta de VII con adyuvantes, podría aumentarse la protección contra este patógeno justificándose la inversión en adyuvantes para la población en general o bien para poblaciones en mayor riesgo (p. ej. adultos mayores y niños muy jóvenes). Otros autores ya han reportado la utilidad del uso de adyuvantes en poblaciones inmunosenescentes en donde la administración de la vacuna contra influenza aumenta los perfiles de citocinas de estos y promueve una respuesta inmune más eficiente especialmente si se adicionan adyuvantes tanto en modelo murino (76) como en humanos (68, 70) o simplemente justifica un costo/beneficio al reducir los gastos por adultos mayores con neumonía (77).

Al realizar los alineamientos de los péptidos con los cristales de HA elegidos, se observó que hubo múltiples aminoácidos que coincidieron con aquellos de los sitios antigénicos de la cabeza globular de influenza. En particular, los grupos de sueros de los animales vacunados con VII+GK-1 y VII+Al(OH)₃ concentraron más la respuesta inmune humoral contra los sitios antigénicos en comparación con la VII sin adyuvante.

Como una forma de corroborar la medida en que se reconoce la cabeza globular en comparación con toda la hemaglutinina de influenza, se realizó el experimento del porcentaje de anticuerpos que reconocen estas regiones. Los resultados de este experimento muestran que para la VII+AIF presentaron un 70% de anticuerpos contra la cabeza globular de hemaglutinina, pero debido a que su capacidad de neutralización del virus es baja, los anticuerpos inducidos en este grupo experimental probablemente hayan sido dirigidos contra epítomos distintos a los de los sitios antigénicos. Para los grupos de VII+GK-1 y VII+Al(OH)₃, el porcentaje reconociendo

la cabeza globular es entre un 4 y 5% más que el grupo de VII solo, mientras que los títulos de VII+GK-1 y VII+Al(OH)₃ son sumamente bajos. Aunado a esto, estos dos últimos grupos fueron los que localizaron los epítomos de reconocimiento de los anticuerpos contra múltiples de los sitios antigénicos de la cabeza globular de hemaglutinina. Esto sugiere una gran complejidad detrás de este sistema y lo mucho que falta por entender y estudiar, pero también el gran potencial de mejoramiento de la respuesta inmune humoral como se mencionó anteriormente.

Tomando en cuenta los resultados mostrados y proponiendo una explicación con respecto al mecanismo detrás de la modificación del repertorio de epítomos reconocidos por los anticuerpos generados tras la vacunación con la VII adicionada con adyuvantes, es necesario considerar diferentes aspectos. En primer lugar, el efecto de los adyuvantes en modificar el reclutamiento de diferentes poblaciones celulares a diferentes tiempos. En este sentido, Souza *et al* han reportado el aumento de neutrófilos a diferentes tiempos en función de los adyuvantes administrados. Mientras que se puede detectar grandes cantidades de neutrófilos al sitio de estímulo con saponina a las 12, 24 y 48 horas, grandes cantidades de este tipo de células se detectan a las 168 y 336 horas al utilizar AIF, mientras que al usar MPL solo se detecta un aumento en neutrófilos a las 12 horas (78) en un modelo murino de inoculación intradérmica. Esto sugiere que diferentes adyuvantes inducen diferentes microambientes que tiene consecuencias en la cinética de reclutamiento de poblaciones celulares potencialmente teniendo efecto en cómo se detecta, se captura y procesa o transporta el antígeno a los nódulos linfáticos proximales y distales (79).

Otro aspecto de los adyuvantes importante a mencionar, es el efecto de “depósito de antígeno”, es decir, la retención del antígeno en el sitio de inoculación y su paulatina liberación. Es importante recalcar que no todos los adyuvantes presentan este fenómeno de mantener el antígeno en el sitio de inoculación y de liberarlo paulatinamente. El Al(OH)₃ se considera como un adyuvante con este fenómeno de “depósito”, mientras que el MF59 no. Aunque el resultado final sea que el antígeno alcance nódulos linfáticos para la activación del sistema inmune independientemente del adyuvante, la biodisponibilidad y el tiempo en que el antígeno está disponible en ganglios no es la misma usando Al(OH)₃, MF59 u otro adyuvante. En el caso del Al(OH)₃, este dosifica el antígeno de manera lenta por lo que la concentración del antígeno es menor en los ganglios mientras que el MF59, a pesar de encontrarse una gran concentración de

este en el espacio extracelular en el sitio de inoculación a las 48 horas posteriores a la inoculación, grandes cantidades del adyuvante y del antígeno alcanzan los ganglios linfáticos rápidamente. Esto sugiere que el $\text{Al}(\text{OH})_3$ permite presentar solo pequeñas y constantes cantidades de antígeno a linfocitos T y B en ganglios, activándose principalmente las poblaciones con una afinidad moderada o alta por el antígeno y por tiempos más prolongados. Por otro lado, debido a que el MF59 le permite llegar una mayor cantidad de antígeno a los ganglios, se activa una gran población de linfocitos T y B de manera más rápida (35-37). Este simple evento de la cinética de entrega y biodisponibilidad del antígeno tiene importantes efectos en la cantidad y tiempo en que aparecen centros germinales así como en la duración de los mismos y la activación de linfocitos B en ellos que, para el caso del MF59, hay una mayor cantidad de estos linfocitos B ($\text{B220}^+ \text{CD38-GL7}^+$) en los centros germinales a comparación con los inducidos por $\text{Al}(\text{OH})_3$ (28, 80-82). Lógicamente, la velocidad de aparición de anticuerpos es más rápida en antígenos mezclados con adyuvantes que no presentan el efecto de depósito en comparación con los que sí, sin embargo, esto no necesariamente es algo malo ya que, con una mayor exposición al antígeno, se genera una mayor maduración de la afinidad de los anticuerpos lo cual potencialmente ocurre con los adyuvantes con efecto de depósito y esto podría ser una explicación de por qué el $\text{Al}(\text{OH})_3$ en nuestro modelo experimental, concentra la respuesta de mimotopos hacia la cabeza globular de hemaglutinina y contra los sitios antigénicos de esta. Aseveración que requiere y amerita un cuidadoso estudio futuro.

Resumiendo lo anteriormente planteado, el uso distintos adyuvantes ocasiona el reclutamiento de poblaciones de linfocitos diferentes, a distintos tiempos; esto debido a la inducción de patrones de citocinas distintos en el sitio de inoculación. Ello afecta la dinámica de la respuesta inmune desde sus etapas más tempranas y posiblemente, afecte también la captura y traslado del antígeno a nódulos linfáticos ya sea procesado o sin procesar. Por otro lado, debido al efecto de “depósito de antígeno” del $\text{Al}(\text{OH})_3$ donde se entrega una menor pero constante cantidad de antígeno por una mayor cantidad de tiempo, poblaciones menos reactivas de linfocitos B y T en los ganglios linfáticos pudieran seleccionarse positivamente. Esto en consecuencia ocasionaría el aumento en la afinidad y avidéz de dichas poblaciones que en otras circunstancias no se verían seleccionadas positivamente. Este aumento en poblaciones de linfocitos B y T que en otro contexto de presentación de antígeno no se seleccionarían positivamente, ocasionaría, en última instancia, la maduración de la afinidad de anticuerpos

enfocados hacia los aminoácidos de los sitios antigénicos de la hemaglutinina de influenza justificando así la restricción del repertorio de anticuerpos.

Planteando un segundo escenario distinto pero plausible e intrigante a la vez, es en el contexto del efecto del adyuvante sobre la agregación o estructura del propio antígeno (más allá de una estructura terciaria como proteína). En el caso de adicionar un adyuvante a un antígeno, cabe la duda de si este pudiera ocasionar la aglomeración o modificar la forma del antígeno en un sentido de una macromolécula más compleja presentada a las células del sistema inmune. Si dicha modificación a nivel de macromolécula le permite un reconocimiento más similar a lo que en condiciones naturales es reconocido por parte del sistema inmune, a diferencia de solamente reconocer una molécula aislada flotando en el medio. Incluso, cabe la duda de si algo en la dinámica de la presentación a las células del sistema inmune es distinto a causa del antígeno que, en cualquier caso, ocasiona que se modifique el reconocimiento del antígeno así como la activación de la respuesta inmune, teniendo así repercusiones en toda la serie de eventos posteriores como en la selección positiva de clonas de linfocitos B y T; provocando así una consecuente producción de anticuerpos capaces de reconocer epítomos distintos en función de diferentes adyuvantes en contra de un mismo antígeno inoculado. En resumen, el presente trabajo aporta evidencia de que los adyuvantes son capaces de modificar la respuesta inmune ya sea modificando la eficacia de la presentación del antígeno, la dinámica entre las diferentes células en los distintos sitios anatómicos y/o la activación de las células del sistema inmune.

Con todo esto, quedan un sin número de preguntas complejas todas sumamente interesantes con un gran potencial para el desarrollo racionalizado de las vacunas del futuro en función del antígeno o patógeno en cuestión, así como del desarrollo racionalizado de las vacunas contra los epítomos más eficientes para generar inmunidad solo por mencionar algunas.

Considerando lo anterior, este trabajo muestra el interesante y poco explorado concepto de la modificación de los epítomos reconocidos por el repertorio de los anticuerpos generados contra la hemaglutinina de influenza por acción de diferentes adyuvantes. Así mismo, nos abre un amplio panorama de posibilidades para investigar más a fondo las condiciones en que este fenómeno ocurre, los adyuvantes capaces de tener este mismo efecto en el repertorio de reconocimiento de epítomos, la reproducibilidad de este fenómeno tanto a otras especies animales como con otros antígenos distintos entre muchas ideas más.

10. Conclusiones

- La VII adicionada con el AIF aumenta los títulos de anticuerpos anti influenza de la subclase IgG1 e IgG2b mientras que Addavax y Al(OH)₃ aumentan los títulos de IgG2a en ratón.
- La inoculación de los adyuvantes GK-1, AddaVax y saponina junto con la VII, aumentan los títulos de neutralización del virus de influenza siendo la saponina el de mayor efecto de los tres.
- Principalmente el péptido GK-1 y en menor medida el Al(OH)₃ adyuvantando la VII enfocan la respuesta inmune humoral en contra de la HA de influenza hacia múltiples aminoácidos pertenecientes a los sitios antigénicos localizados en la cabeza globular de esta proteína del virus en comparación con la VII sin adyuvante la cual induce anticuerpos contra múltiples regiones de HA de influenza comprendiendo la cabeza globular y el tallo.
- Ninguno de los péptidos de las clonas de la biblioteca de fagos seleccionadas por los anticuerpos de los sueros de los animales vacunados presentó una secuencia consenso con HA por lo que se tratan de mimotopos conformacionales.

11. Perspectivas a futuro

El presente trabajo se centró en estudiar más a profundidad el efecto de los adyuvantes en la respuesta inmune humoral en contra de la influenza humana y en particular en el efecto en el repertorio de los epítomos reconocidos por dichos anticuerpos en contra de la hemaglutinina. Derivado de los resultados y de una visión crítica de estos se proponen posibles líneas de investigación futuras para el desarrollo de este proyecto.

Ya que uno de los efectos de los adyuvantes es modificar los patrones y cantidades de citocinas secretadas posterior a la vacunación, será de interés determinar el efecto de la adición de los diferentes adyuvantes usados a la VII en los patrones y cantidades de citocinas secretadas por cultivos celulares de esplenocitos de animales vacunados y estimulación de las células con la VII. Así mismo, debido al importante efecto que tienen los adyuvantes en inducir la secreción de citocinas para poblaciones seniles, se sugiere la comparación de patrones y cantidades de citocinas en sobrenadantes de esplenocitos entre poblaciones de ratones jóvenes (6 – 8 semanas) y envejecidos (>1.5 años) (76, 83).

Como se mencionó anteriormente, Khurana *et al* han reportado que la VII en conjunto con el adyuvante MF59 es capaz de ampliar el repertorio de anticuerpos para reconocer más sitios antigénicos de la HA de influenza (67). Con base en estos reportes previos, se recomienda repetir los análisis del presente trabajo con dicho adyuvante (ya sea el análogo comercial empleado en este trabajo o con el de patente de Novartis) para determinar el efecto en el repertorio de los anticuerpos extendiendo su estudio a determinación de patrones de citocinas en ratones jóvenes y ratones seniles.

Otras líneas sumamente interesantes serían el estudio de diferentes adyuvantes con un antígeno más simple (p. ej. hemaglutinina recombinante de una sola cepa de influenza) así como estudiar el efecto de diferentes antígenos en combinación con distintos adyuvantes ya sea en perfiles de citocinas, dinámicas de ganglios linfáticos, repertorio de epítomos reconocidos, etc.

12. Referencias bibliográficas

1. Hammarsten JF, Tattersall W, Hammarsten JE. Who discovered smallpox vaccination? Edward Jenner or Benjamin Jesty? Transactions of the American Clinical and Climatological Association. 1979;90:44-55.
2. Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. Proceedings. 2005;18(1):21-5.
3. Plotkin SA. History of vaccine development. New York: Springer; 2011. xiii, 349 p. p.
4. Plotkin S. History of vaccination. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014;111(34):12283-7.
5. Gross CP, Sepkowitz KA. The myth of the medical breakthrough: smallpox, vaccination, and Jenner reconsidered. International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases. 1998;3(1):54-60.
6. WHO. Global Vaccine Action Plan 2011-2020 WHO Library Cataloguing-in-Publication Data2013 [Available from: https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/.
7. Cherian T, Okwo-Bele JM. The decade of vaccines global vaccine action plan: shaping immunization programmes in the current decade. Expert review of vaccines. 2014;13(5):573-5.
8. Shah RR, Hassett KJ, Brito LA. Overview of Vaccine Adjuvants: Introduction, History, and Current Status. In: Fox CB, editor. Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 1-13.
9. Desmond A, Offit PA. On the Shoulders of Giants - From Jenner's Cowpox to mRNA Covid Vaccines. N Engl J Med. 2021;384(12):1081-3.
10. Janeway CA, Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology. 1989;54 Pt 1:1-13.
11. Burakova Y, Madera R, McVey S, Schlup JR, Shi J. Adjuvants for Animal Vaccines. Viral immunology. 2018;31(1):11-22.
12. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. Vaccines (Basel). 2015;3(2):320-43.
13. Ghimire TR. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. SpringerPlus. 2015;4:181.
14. Burny W, Callegaro A, Bechtold V, Clement F, Delhaye S, Fissette L, et al. Different Adjuvants Induce Common Innate Pathways That Are Associated with Enhanced Adaptive Responses against a Model Antigen in Humans. Frontiers in immunology. 2017;8:943.

15. Ciabattini A, Pettini E, Fiorino F, Pastore G, Andersen P, Pozzi G, et al. Modulation of Primary Immune Response by Different Vaccine Adjuvants. *Frontiers in immunology*. 2016;7:427.
16. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *The Journal of clinical investigation*. 2016;126(3):799-808.
17. Glenny AT, Buttle GAH, Stevens MF. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea - pigs: Toxoid precipitated with alum. *J Pathol Bacteriol* 1931;34(2):267-75.
18. Egli A, Santer D, Barakat K, Zand M, Levin A, Vollmer M, et al. Vaccine adjuvants-understanding molecular mechanisms to improve vaccines. *Swiss medical weekly*. 2014;144:w13940.
19. Heath PT, Galiza EP, Baxter DN, Boffito M, Browne D, Burns F, et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2021;385(13):1172-83.
20. Reimer JM, Karlsson KH, Lovgren-Bengtsson K, Magnusson SE, Fuentes A, Stertman L. Matrix-M adjuvant induces local recruitment, activation and maturation of central immune cells in absence of antigen. *PLoS One*. 2012;7(7):e41451.
21. Ward BJ, Gobeil P, Seguin A, Atkins J, Boulay I, Charbonneau PY, et al. Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19. *Nature medicine*. 2021;27(6):1071-8.
22. Garcon N, Vaughn DW, Didierlaurent AM. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing alpha-tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion. *Expert review of vaccines*. 2012;11(3):349-66.
23. Apostolico J de S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *Journal of immunology research*. 2016;2016:1459394.
24. Chamberlain A, Gronvall GK. Immune-boosting adjuvants. *Biosecurity and bioterrorism : biodefense strategy, practice, and science*. 2007;5(3):202-5.
25. Tregoning JS, Russell RF, Kinnear E. Adjuvanted influenza vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2018;14(3):550-64.
26. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 2019;37(24):3167-78.
27. He P, Zou Y, Hu Z. Advances in aluminum hydroxide-based adjuvant research and its mechanism. *Human vaccines & immunotherapeutics*. 2015;11(2):477-88.

28. Pedersen GK, Worzner K, Andersen P, Christensen D. Vaccine Adjuvants Differentially Affect Kinetics of Antibody and Germinal Center Responses. *Frontiers in immunology*. 2020;11:579761.
29. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. *Immunity*. 2010;33(4):492-503.
30. Awate Sa, Babiuk L, Mutwiri G. Mechanisms of Action of Adjuvants. *Frontiers in immunology*. 2013;4(114).
31. Wen Y, Shi Y. Alum: an old dog with new tricks. *Emerging microbes & infections*. 2016;5:e25.
32. McKee AS, Marrack P. Old and new adjuvants. *Curr Opin Immunol*. 2017;47:44-51.
33. Marichal T, Ohata K, Bedoret D, Mesnil C, Sabatel C, Kobiyama K, et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nature medicine*. 2011;17(8):996-1002.
34. Aghebati-Maleki L, Bakhshinejad B, Baradaran B, Motallebnezhad M, Aghebati-Maleki A, Nickho H, et al. Phage display as a promising approach for vaccine development. *Journal of biomedical science*. 2016;23(1):66.
35. Dupuis M, Murphy TJ, Higgins D, Ugozzoli M, van Nest G, Ott G, et al. Dendritic cells internalize vaccine adjuvant after intramuscular injection. *Cell Immunol*. 1998;186(1):18-27.
36. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol*. 2001;70(6):849-60.
37. Tam HH, Melo MB, Kang M, Pelet JM, Ruda VM, Foley MH, et al. Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(43):E6639-E48.
38. Calabro S, Tritto E, Pezzotti A, Taccone M, Muzzi A, Bertholet S, et al. The adjuvant effect of MF59 is due to the oil-in-water emulsion formulation, none of the individual components induce a comparable adjuvant effect. *Vaccine*. 2013;31(33):3363-9.
39. Zhang J, Miao J, Han X, Lu Y, Deng B, Lv F, et al. Development of a novel oil-in-water emulsion and evaluation of its potential adjuvant function in a swine influenza vaccine in mice. *BMC Vet Res*. 2018;14(1):415.
40. Parra-Rojas C, Messling VV, Hernandez-Vargas EA. Adjuvanted influenza vaccine dynamics. *Scientific reports*. 2019;9(1):73.
41. Sun HX, Xie Y, Ye YP. Advances in saponin-based adjuvants. *Vaccine*. 2009;27(12):1787-96.

42. Keech C, Albert G, Cho I, Robertson A, Reed P, Neal S, et al. Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine. *N Engl J Med.* 2020;383(24):2320-32.
43. Spickler AR, Roth JA. Adjuvants in veterinary vaccines: modes of action and adverse effects. *Journal of veterinary internal medicine.* 2003;17(3):273-81.
44. Marciani DJ. Elucidating the Mechanisms of Action of Saponin-Derived Adjuvants. *Trends in pharmacological sciences.* 2018;39(6):573-85.
45. Segura-Velazquez R, Fragoso G, Sciutto E, Sarukhan A. Towards Identification of the Mechanisms of Action of Parasite-Derived Peptide GK1 on the Immunogenicity of an Influenza Vaccine. *Clinical and Vaccine Immunology.* 2009;16(9):1338-43.
46. Segura-Velazquez R, Perez-Torres A, Rosas G, Toledo A, Restelli M, Acosta E, et al. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine.* 2006;24(8):1073-80.
47. Negi SS, Braun W. Automated detection of conformational epitopes using phage display Peptide sequences. *Bioinformatics and biology insights.* 2009;3:71-81.
48. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry.* 2004;25(13):1605-12.
49. Wilson IA, Skehel JJ, Wiley DC. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature.* 1981;289(5796):366-73.
50. Brownlee GG, Fodor E. The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences.* 2001;356(1416):1871-6.
51. Caton AJ, Brownlee GG, Yewdell JW, Gerhard W. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell.* 1982;31(2 Pt 1):417-27.
52. Huang JW, Lin WF, Yang JM. Antigenic sites of H1N1 influenza virus hemagglutinin revealed by natural isolates and inhibition assays. *Vaccine.* 2012;30(44):6327-37.
53. Matsuzaki Y, Sugawara K, Nakauchi M, Takahashi Y, Onodera T, Tsunetsugu-Yokota Y, et al. Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. *J Virol.* 2014;88(21):12364-73.
54. Sriwilaijaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proceedings of the Japan Academy Series B, Physical and biological sciences.* 2012;88(6):226-49.

55. Xu R, Ekiert DC, Krause JC, Hai R, Crowe JE, Jr., Wilson IA. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science*. 2010;328(5976):357-60.
56. Ni F, Kondrashkina E, Wang Q. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin. *Virology*. 2013;446(1-2):112-22.
57. Fulton BO, Sun W, Heaton NS, Palese P. The Influenza B Virus Hemagglutinin Head Domain Is Less Tolerant to Transposon Mutagenesis than That of the Influenza A Virus. *J Virol*. 2018;92(16).
58. Shen J, Kirk BD, Ma J, Wang Q. Diversifying selective pressure on influenza B virus hemagglutinin. *Journal of medical virology*. 2009;81(1):114-24.
59. Wang Q, Cheng F, Lu M, Tian X, Ma J. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J Virol*. 2008;82(6):3011-20.
60. Huber VC, McKeon RM, Brackin MN, Miller LA, Keating R, Brown SA, et al. Distinct contributions of vaccine-induced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2a antibodies to protective immunity against influenza. *Clin Vaccine Immunol*. 2006;13(9):981-90.
61. Hovden AO, Cox RJ, Haaheim LR. Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. *Scandinavian journal of immunology*. 2005;62(1):36-44.
62. Hauge S, Madhun AS, Cox RJ, Brokstad KA, Haaheim LR. A comparison of the humoral and cellular immune responses at different immunological sites after split influenza virus vaccination of mice. *Scandinavian journal of immunology*. 2007;65(1):14-21.
63. Carter D, Reed SG. Role of adjuvants in modeling the immune response. *Curr Opin HIV AIDS*. 2010;5(5):409-13.
64. Eisenbarth SC, Colegio OR, O'Connor W, Sutterwala FS, Flavell RA. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminium adjuvants. *Nature*. 2008;453(7198):1122-6.
65. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(30):10501-6.
66. Cervantes-Torres J, Gracia-Mora I, Segura-Velazquez R, Montero-Montoya R, Espinosa-Aguirre J, M EG, et al. Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity. *Immunopharmacology and immunotoxicology*. 2019;41(1):140-9.
67. Khurana S, Chearwae W, Castellino F, Manischewitz J, King LR, Honorkiewicz A, et al. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Science translational medicine*. 2010;2(15):15ra5.

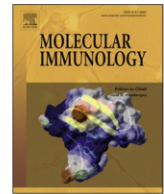
68. Khurana S, Verma N, Talaat KR, Karron RA, Golding H. Immune response following H1N1pdm09 vaccination: differences in antibody repertoire and avidity in young adults and elderly populations stratified by age and gender. *The Journal of infectious diseases*. 2012;205(4):610-20.
69. Maeda D, Batista MT, Pereira LR, de Jesus Cintra M, Amorim JH, Mathias-Santos C, et al. Adjuvant-Mediated Epitope Specificity and Enhanced Neutralizing Activity of Antibodies Targeting Dengue Virus Envelope Protein. *Frontiers in immunology*. 2017;8:1175.
70. Khurana S, Verma N, Yewdell JW, Hilbert AK, Castellino F, Lattanzi M, et al. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines. *Science translational medicine*. 2011;3(85):85ra48.
71. Verma N, Dimitrova M, Carter DM, Crevar CJ, Ross TM, Golding H, et al. Influenza virus H1N1pdm09 infections in the young and old: evidence of greater antibody diversity and affinity for the hemagglutinin globular head domain (HA1 Domain) in the elderly than in young adults and children. *Journal of virology*. 2012;86(10):5515-22.
72. Kay BK, Kasanov J, Yamabhai M. Screening phage-displayed combinatorial peptide libraries. *Methods*. 2001;24(3):240-6.
73. Upton GJG, Cook I, Oxford University Press. *A dictionary of statistics*. Oxford: Oxford University Press; 2008. Available from: <http://www.oxfordreference.com/view/10.1093/acref/9780199541454.001.0001/acref-9780199541454>.
74. Casali P, Schettino EW. Structure and function of natural antibodies. *Current topics in microbiology and immunology*. 1996;210:167-79.
75. Elkon K, Casali P. Nature and functions of autoantibodies. *Nature clinical practice Rheumatology*. 2008;4(9):491-8.
76. Yam KK, Gupta J, Allen EK, Burt KR, Beaulieu E, Mallett CP, et al. Comparison of AS03 and Alum on immune responses elicited by A/H3N2 split influenza vaccine in young, mature and aged BALB/c mice. *Vaccine*. 2016;34(12):1444-51.
77. Deans GD, Stiver HG, McElhaney JE. Influenza vaccines provide diminished protection but are cost-saving in older adults. *Journal of internal medicine*. 2010;267(2):220-7.
78. Vitoriano-Souza J, Moreira N, Teixeira-Carvalho A, Carneiro CM, Siqueira FA, Vieira PM, et al. Cell recruitment and cytokines in skin mice sensitized with the vaccine adjuvants: saponin, incomplete Freund's adjuvant, and monophosphoryl lipid A. *PLoS One*. 2012;7(7):e40745.
79. Calabro S, Tortoli M, Baudner BC, Pacitto A, Cortese M, O'Hagan DT, et al. Vaccine adjuvants alum and MF59 induce rapid recruitment of neutrophils and monocytes that participate in antigen transport to draining lymph nodes. *Vaccine*. 2011;29(9):1812-23.

80. Aradottir Pind AA, Dubik M, Thorsdottir S, Meinke A, Harandi AM, Holmgren J, et al. Adjuvants Enhance the Induction of Germinal Center and Antibody Secreting Cells in Spleen and Their Persistence in Bone Marrow of Neonatal Mice. *Frontiers in immunology*. 2019;10:2214.
81. Andersen TK, Huszthy PC, Gopalakrishnan RP, Jacobsen JT, Fauskanger M, Tveita AA, et al. Enhanced germinal center reaction by targeting vaccine antigen to major histocompatibility complex class II molecules. *NPJ Vaccines*. 2019;4:9.
82. Lofano G, Mancini F, Salvatore G, Cantisani R, Monaci E, Carrisi C, et al. Oil-in-Water Emulsion MF59 Increases Germinal Center B Cell Differentiation and Persistence in Response to Vaccination. *J Immunol*. 2015;195(4):1617-27.
83. Yam KK, Gupta J, Winter K, Allen E, Brewer A, Beaulieu E, et al. AS03-Adjuvanted, Very-Low-Dose Influenza Vaccines Induce Distinctive Immune Responses Compared to Unadjuvanted High-Dose Vaccines in BALB/c Mice. *Frontiers in immunology*. 2015;6:207.

13. Anexo

Al día 75 de la vacunación de los animales, se sangraron a blanco y se sacrificaron por dislocación cervical. Previo a la introducción de los cadáveres a la campana de flujo laminar, éstos se rociaron con benzal para mantener esterilidad de los cultivos. Se procedió a hacer una esplenectomía colocando los bazos en 3 ml de medio RPMI (Gibco) para posteriormente macerarlos empleando una malla de nylon de 50 µm. Los sobrenadantes se colocaron en hielo por separado hasta su centrifugación a 1500 rpm, 5 min a 4°C en una centrífuga refrigerada Sorvall ST 40R (Thermo Scientific®). El pellet se re-suspendió en 3 ml de solución de lisis de eritrocitos (0.156 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.12 mM EDTA, 250 ml H₂O filtrado y esterilizado) incubándose en hielo por 5 minutos con agitación constante. Transcurrido el tiempo, se adicionó 3 veces el volumen de la solución de lisis de medio RPMI sin suplementar y se centrifugó a 1200 rpm, 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendió el pellet en 3 ml de RPMI suplementado [50 ml RPMI (Gibco), 5 ml suero fetal bobino, 500 µl penicilina/estreptomicina (Gibco), 500 µl de L-glutamina (Gibco) 500 µl β-mercaptoetanol; preparado en condiciones de esterilidad]. Se contaron células viables en campana de Neubauer haciendo una dilución 1:1 con azul tripano dentro de la campana de flujo laminar.

Para teñir las células con CFSE, se preparó una dilución 1:100 tomando 10 μl de CFSE 5 mM (Molecular Probes) y llevada a volumen final de 1000 μl con PBS 1X estéril. Se transfirieron a un nuevo tubo 10x10⁶ células y se centrifugaron a 12000 rpm, 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se re-suspendieron perfectamente las células en el remanente del medio. Luego, se adicionaron 10 μl de la dilución 1:100 CFSE (volumen final aproximado de 100 μl) y se incubaron las células a 37 °C durante 10 min con agitación cada 2 minutos durante la incubación. Una vez terminada la incubación, se lavaron las células con 2 ml de RPMI suplementado FRÍO dos veces centrifugando las células posterior a cada lavado y se re-suspendieron finalmente en 4 ml medio RPMI suplementado para una concentración final de 2.5x10⁶ células/mL. Se transfirió 1 mL de la suspensión celular a placas de cultivo de 24 pozos por cada condición de cultivo (Medio, Vacuna Influenza [1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y Concavalina A [2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$]). Las placas se incubaron a 37°C, 5% CO₂ por 4 días y se cosecharon las células centrifugando la placa a 1200 rpm, 5 min 4°C y se re-suspendieron en 500 μl de buffer de tinción (PBS 1x, 0.02% azida de sodio, 5% suero fetal bovino) para su conteo. Las células se ajustaron a un número de 5X10⁵ para su tinción con los anticuerpos anti-CD4 PerCPCy5.5 (clona RM4-5, Pharmingen) y anti-CD8 PE (clona 53-6.7 Pharmingen) en las concentraciones adecuadas indicadas por el proveedor durante 25 minutos a 4°C en buffer de tinción. Las células se capturaron en un citómetro Attune NxT (Thermo Scientific) y analizaron mediante el Software FlowJo 7.6.2.



Influence of adjuvants on the amount, specificity and functional activity of antibody response to human influenza vaccine in mice

Juan Voutssas-Lara^a, Jacquelynne Cervantes-Torres^a, Marisela Hernández^a, Raúl J. Bobes^a, Edmundo Lamoyi^a, Ricardo A. Vázquez-Ramírez^a, Luis Mendoza^a, Karen L. Reyes-Barrera^b, Rogelio López-Martínez^a, Ángel G. Alpuche-Solís^b, Sergio Rosales-Mendoza^c, Leonor Huerta^a, Gladis Fragoso^a, Edda Sciotto^{a,*}

^a Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Av. Universidad 3000, CP 04510, Ciudad de México, Mexico

^b División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A. C., Camino a la Presa San José 2055, Lomas 4ta sección, San Luis Potosí, 78216, Mexico

^c Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª Sección, San Luis Potosí, S.L.P.78210, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Vaccines
Influenza
Adjuvants
Phage display
Epitope repertoire
Immune response modulation

ABSTRACT

It's been almost a century since immunologists started using adjuvants as tools to develop more effective vaccines. Despite the rising number of adjuvanted vaccines in the last decades, we still lack knowledge of the adjuvants' effects on antibody response.

This study was aimed to test the effect of immunizing mice with the human Inactivated Influenza vaccine (IIV), either alone or combined with different widely used adjuvants on the specific antibody response induced. Differential levels of IgM and IgG subclasses were found with the different adjuvants tested. Higher levels of antibodies did not always correspond with a higher efficacy to interfere with the virus infectivity. Differences in neutralization properties are possibly mediated by the specificity of the repertoire of antibodies induced. The repertoire was studied using a phage display 7-mer peptide library to screen for epitopes/mimotopes recognized by serum pools from vaccinated mice. The selected phage clones included peptides that corresponded to conformational mimotopes since they have no homology with lineal sequences of the Influenza strains' proteins. Five peptides were identified as recognized by sera from mice immunized with the IIV vaccine alone, including peptides from the hemagglutinin stalk domain, and by sera from mice immunized with the vaccine plus the different adjuvants employed. Adjuvants elicited a more diverse repertoire of epitope-recognizing antibodies that recognized epitopes of the HA recombinant globular head. Mimotopes were theoretically located at the neutralizing antigenic sites of the globular head of Influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2, and Influenza B hemagglutinin.

This study illustrates how different adjuvants can modify the extent and quality of humoral immunity against the IIV vaccine and the effectiveness of vaccination.

1. Introduction

The protective immune profile induced by vaccination is related to the host's specific immunity elicited against the corresponding pathogen. In order to enhance the specific immunity induced by vaccination, adjuvants have been used in conjunction with vaccines. It's been almost a century since vaccinologists started using aluminum salts as adjuvants

(Burakova et al., 2018; Burny et al., 2017; Ciabattini et al., 2016; Ghimire, 2015; Glenny et al., 1931; Moyer et al., 2016) and the great efforts on adjuvant research made so far have shed some light on their molecular mechanism of adjuvanticity and immune response polarization when coadministered with immunogens (McKee and Marrack, 2017; Shi et al., 2019; Tregoning et al., 2018). This knowledge has helped to develop new refined adjuvants such as monophosphoryl lipid A (MPLA),

* Corresponding author at: Immunology Department, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, 04510, Mexico.

E-mail address: edda@unam.mx (E. Sciotto).

<https://doi.org/10.1016/j.molimm.2021.05.003>

Received 28 October 2020; Received in revised form 14 April 2021; Accepted 4 May 2021
0161-5890/© 2021 Published by Elsevier Ltd.

MF59 or adjuvant systems such as ISCOMS, AS01 to 04 or S6322 (McKee and Marrack, 2017).

One of the effects of administering adjuvants with an immunogen is the augmentation of antibody (Ab) responses. However, it is known that Ab responses may vary their efficiency to prevent infection depending on multiple aspects besides Ab levels, namely classes and subclasses of Abs induced (Balkovic et al., 1987; Julkunen et al., 1985; Khurana et al., 2012), their respective affinities (Chung et al., 2015; Khurana et al., 2012; Pettersen et al., 2004) as well as the repertoire of pathogen epitopes recognized (Deans et al., 2010; Khurana et al., 2011; Spitaels et al., 2016). Despite the great efforts made so far to better understand adjuvants and their effect in Abs' properties polarization, there are many questions yet unanswered.

Influenza viruses are one of the challenging pathogens that affect human population every year. Estimations from the World Health Organization (including Influenza A H1N1, H3N2 and Influenza B) report 3–5 million cases and 290,000–650,000 deaths annually with a considerable cost for economies worldwide (Federici et al., 2018). Vaccination is still one of the most cost-effective policies to control this disease. However, the effectiveness of vaccines varies because of the high frequency of genetic shift and drift among Influenza virus strains, besides the weak immunity induced in immunocompromised subjects or naturally low immune responders, such as children and the elderly. The addition of adjuvants to improve the vaccine-induced immunity is one of the most extensively used approaches to overcome this limitation. Recently, the Food and Drug Administration in the United States has approved the formulation of an Influenza vaccine with MF59 adjuvant (Cruz-Valdez et al., 2018) in order to improve its efficacy (Schaffner et al., 2018).

Influenza's hemagglutinin (HA) antigenic sites are amino acids present at the globular head which their binding with antibodies cause virus neutralization preventing cell infection. Antibodies against these antigenic sites highly correlate with the efficacy of Influenza vaccine (Balkovic et al., 1987; Benne et al., 1997; Cherian and Okwo-Bele, 2014; Gulati et al., 2005; Pedersen et al., 2014; WHO, 2013; Yam et al., 2016).

It is known that different adjuvants can differentially modify antibody specificity (Hui et al., 1991; Zlatkovic et al., 2013). Thus, it could be possible to enhance the antibody response to these HA epitopes depending on the adjuvant used.

This study was designed to further investigate the effect of some of the most widely used adjuvants in human and experimental vaccines combined with the human Influenza vaccine on the antibody response. The influenza vaccine was selected since it exhibited a low efficacy in the most susceptible populations to the virus. For this reason, it has been formulated with different adjuvants to improve its efficacy (Tregoning et al., 2018).

2. Materials and methods

2.1. Mice

All animals were bred in the Biological Models Unit of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Experiments were conducted in strict accordance with national guidelines (Norma Oficial Mexicana, NOM-062-ZOO-1999) and approved by the Institute's Bioethics Committee for the care and use of laboratory animals. Also, experiments were conducted in accordance with the principles set forth in the ARRIVE guidelines and the EU Directive 2010/63/EU for animal experiments.

2.2. Immunization

Seven groups of seven 6–8 weeks old female BALB/cAnN mice were subcutaneously immunized in the dorsal flank (25Gx5/8" needle) with 1 µg total HA of the trivalent human Inactivated Influenza vaccine (IIV) Fluarix trivalent (Glaxo Smith Klein) (Lot: XFLUA873AA) containing

Influenza A H1N1 pdm09 (2009), Influenza A H3N2 (2013), and Influenza B (2013) diluted in saline to a final volume of 200 µL per mouse, whether alone or in conjunction with a single adjuvant. Employed adjuvants were Saponin (Sigma), Incomplete Freund's Adjuvant (IFA) (Sigma), commercial AddaVax (MF59 analog, Invivogen), aluminum hydroxide [Al(OH)₃] (kindly donated by Dr. Juan Garza-Ramos, PRO-NABIVE México) or GK-1. The latter is a *Taenia crassiceps*-derived peptide with sequence GYYPSDPNTFFYPYSA previously reported by our group to have adjuvant properties (Segura-Velazquez et al., 2009, 2006). The peptide was chemically synthesized by USV Ltd, Mumbai, India. Adjuvanted IIV was administered as follows: Saponin (50 µg/mouse in saline) directly mixed with IIV; IFA, AddaVax, and Al(OH)₃ (mixed 1:1 with IIV to a final volume of 200 µL) and GK-1 (10 µg/mouse in 100 µL of saline and 100 µL of IIV inoculated separately on opposite flanks as previously reported) (Segura-Velazquez et al., 2009, 2006). Mice were kept with food and water *ad libitum* and monitored daily. Blood samples were taken at day 65 after vaccination for determining class and subclass antibodies titers of individual mice. A terminal bleeding was made for phage display epitope mapping at day 75; serum was isolated and a pool per experimental group was made with 50 µL of serum from each mouse, aliquoted, and frozen at –20 °C until use.

2.3. Anti-Influenza hemagglutinin antibodies

Ninety-six-flat bottom well plates (NUNC) were sensitized either with 0.1 µg of IIV or the recombinant HA head of Influenza B (Sino Biological, Cat: 40,016-V08H1) per well diluted in carbonate buffer pH 9.5 for 18 h at 4 °C, washed three times with PBS-Tween 0.3 % (PBST), blocked with PBS-BSA 1% (PBSB) for 1 h at 37 °C and washed three times with PBST. Then, individual sera from vaccinated mice from all groups were initially diluted 1/100 in blocking buffer and placed in the wells of the first column and two-fold serially diluted for the remaining 11 wells. Plates were then incubated 1 h at 37 °C followed by three washes with PBST and incubated with the secondary Ab diluted as follows in PBSB [goat anti-mouse (GAM) IgG1-AP 1:20 000, GAM IgG2a 1:2000, GAM IgG2b 1:20 000 (Thermo Scientific), GAM IgG3 1:10 000 (Invitrogen), GAM IgM 1:20 000 (BD Pharmingen)]. Plates were then incubated 1 h at 37 °C and washed three times with PBST. The substrate *p*-nitrophenyl phosphate (Sigma) was added to the wells, incubated according to suppliers' time and temperature specifications and read at 405 nm in an Epoch plate spectrophotometer (Biotek). Ab dilution vs log₂ OD graphs per mouse were plotted and from each straight-line equation, the class/subclass log₂ titer was calculated using a cutoff value of three times the mean OD of the uninoculated mice control group as the y-intercept and class/subclass Ab mean titer per group ± Standard Deviation (SD) was reported.

The percentage of IgGs that recognized the globular head relative to total IIV was estimated dividing the optical density obtained from an ELISA assay using the globular head as the source of antigen vs. the optical density from a parallel ELISA assay using the complete vaccine as the antigen multiplied by 100.

2.4. Neutralization assay

Human Influenza A H1N1pdm09 virus isolated at Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) during the 2009 outbreak in México (Ramírez-Martínez et al., 2013; Zumiga et al., 2011) was propagated in MDCK cells and the whole supernatant batch was aliquoted and frozen in liquid nitrogen until use. The virus was titrated to obtain the batch's TCID₅₀ (Kawaoka and Neumann, 2012; Spackman, 2012). Serum pools from each experimental group were made using the same amount of serum from each mouse. After heat inactivation, aliquots were frozen at –20 °C until use. For virus neutralization, freshly thawed virus (100 TCID₅₀) was mixed with serial 1:2 dilutions of sera (1:400 – 1:100,000) in a final volume of 100 µL in dilution media (MEM, 0.5 µg/ml trypsin-TPCK, 0.3 % BSA) in 96-well plates, and incubated for 1 h

at 37 °C with 5 % CO₂. Then, 100 µL of the mixture was transferred to MDCK cell monolayers (50,000 cells/well in 96-well plates) and incubated for 24 h at 37 °C with 5 % CO₂. Untreated cells and cells inoculated with undiluted virus were included as negative and positive controls respectively. After cytopathic effect was observed, cells monolayers were fixed with 10 % formaldehyde for 2 h at 4 °C, crystal violet stained and air dried. The cytopathic effect was read in blind by a qualified analyst. The last serum dilution where no cytopathic effect on the cells was observed was registered as the last neutralizing dilution for the specific sera. All assays were performed by triplicate.

2.5. Screening of a phage display random peptide library (RPL)

Considering that Phage display is a well-established procedure for screening peptide libraries that frequently yield strong binding partners for disease-related proteins, the 7-mer RPL from New England Bio Labs (NEB) was used for phage screening with pools of sera from each of the different experimental groups. Briefly, per sera pool group, four wells of a microtiter plate (96-well flat-bottom plate NUNC) were coated with 0.2 µg/well goat anti-mouse IgG Fc (Sigma) in carbonate buffer pH 9.5 for 1 h at 37 °C. Wells were washed four times with PBS-Tween 0.3 % (PBST) and blocked with PBS-skim milk 2 % (PBSM) for 1 h at 37 °C followed by four washes with PBST. A 1:100 dilution of the respective serum pools in PBS-milk 2 %-Tween 0.2 % (PBSMT) was placed in the well and incubated for 1 h at 37 °C; simultaneously, a 400 µL dilution of the RPL in PBSM to a final concentration of $1 \times 10^9 - 10^{11}$ PFU/well was made and pre-incubated for 30 min at room temperature (RT). Each well was washed five times and 100 µL of the pre-incubated RPL dilution was placed in each well, then, the plate was sealed and incubated overnight (ON) at 4 °C. The next day, wells were washed seven times with PBST and bound phages were eluted with Glycine-HCl buffer for 5 min at RT and 10 min at 37 °C. Supernatant was collected in a centrifuge tube and immediately neutralized with 20 µL of Tris-base 2 M. From this neutralized supernatant, 360 µL were inoculated to 50 mL of an ON *E. coli* TG1 culture in 2xYT media in an Erlenmeyer flask and incubated first 30 min at 37 °C static and later 4.5 h at 37 °C, 250 rpm in a shaker incubator (Lab-Line) for phage amplification; the rest of the eluted supernatant was saved for panning round phage titrating. Bacteria and amplified phages were sedimented in a refrigerated ultra-centrifuge (Beckman) for 10 min at 10 000 rpm (~9630 x g), 4 °C and the supernatant was collected and PEG/NaCl buffer (1/5 of the volume) was added, mixed, and incubated ON at 4 °C. The next day, phages were ultra-centrifuged for 10 min at 10 000 rpm (~7850 x g), 4 °C and precipitated phages pellet was resuspended in 500 µL of sterile TBS followed by two centrifugations for 10 min at 13 000 rpm (~16100 x g) at 4 °C in a micro tube centrifuge (Eppendorf) to finish the panning round. A total of three panning rounds were performed and the pre-amplification supernatant so as the amplified and concentrated phage supernatant per round per selection sera pool were titered as an amplification control (data not shown) as recommended by supplier's protocol.

2.6. Reactivity of phage clones with panning sera

Fifteen random colonies from the third panning round titration from each vaccination group were picked; amplified, purified, and total protein was determined by Lowry method. In a 96-well flat-bottom plate (NUNC) per vaccination group, duplicate wells per clone were sensitized with 10 µg of total protein per well diluted in carbonate buffer pH 9.5 for 1 h at 37 °C and washed six times with PBS-Tween 0.3 % (PBST*) using a plate washer (Biotek). Plates were then blocked with PBSM for 1 h at 37 °C, washed six times with PBST* and 100 µL per well of a 1:200 dilution of the serum in PBSM-Triton X-100 0.2 % (PBSMT) was added followed by 1 h incubation at 37 °C. Then, plates were washed six times and 100 µL per well of a 1:2500 dilution of GAM-HRP secondary Ab (Thermo Scientific) in PBSMT was added and incubated for 1 h at 37 °C

followed by six washes. Lastly, 100 µL per well of tetramethylbenzidine (TMB) (Life Technologies) was added, incubated for 10 min at 37 °C, and reaction was stopped with a 0.2 M H₂SO₄ (Sigma) and read at 450 nm in a plate reader Epoch (Biotek). The average + 3 SD (Fig. 2 dashed line) of the signal from saline or adjuvant alone bars per experimental group (which includes 99 % of the negative population) was set as a threshold line. All positive reactive clones which gave signal beyond the threshold line were re-assayed to confirm their specificity against the serum with which they were panned to avoid false positives.

2.7. Phage DNA extraction and sequencing

Positive confirmed clones were amplified, purified, and ssDNA was extracted according to NEB phage display libraries manual by sodium iodide buffer method. DNA extracts were run in a 0.8 % agarose gel containing SYBR green (Thermo) 1:10 000 dilution at 100 V and imaged with a MiniBIS Pro (DNR) to confirm purity. DNA quantity and quality were determined using a Nanodrop 2000 spectrophotometer (Thermo) then sequenced (Genetic Analyzer 3500xL, Applied Biosystems) at the Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud, UNAM using the -96 gIII primer (5'-^{HO}CCCTCATAGTTAGCGTAACG-3').

2.8. Bioinformatics prediction of conformational epitopes/mimotopes

After sequencing positive clones, each phage expressed peptide was aligned with all Influenza's proteins using two different servers (EMBL-EBI, <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> (Madeira et al., 2019) and MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/>) (Corpet, 1988). Sequences from all Influenza proteins from the three employed strains were downloaded from the Influenza Research Database (<https://www.fludb.org>) and were compared a single Influenza protein with a single peptide at a time. Conformational mimotopes prediction was performed using Episearch server (<http://curie.utmb.edu/episearch.html>) (Negi and Braun, 2009). Molecular graphics and analyses were performed with UCSF Chimera version 1.13.1 (Pettersen et al., 2004). HA crystal structures of human Influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2, and Influenza B were downloaded from Protein Data Bank (PDB: www.rcsb.org). From the crystal structures of Influenza A H1N1 and Influenza B downloaded from PDB, the best structures were selected with the following criteria: HA with both peptidic chains [HA1 (chain A) and HA2 (chain B)] forming a complex without experimental mutations in important residues or bound to a ligand or Abs. Structures which did not met the previous criteria were discarded. Influenza A H1N1 structural analysis was carried out with the following PDB codes: 3M6S, 4LXV, 4M4Y, 3UBQ, and 4JU0. A root mean square deviation (RMSD) was calculated for all of them and between them to determine their similarity choosing 3M6S for Influenza A H1N1 and 4FQM for Influenza B as the best comparison crystals. In the case of Influenza A H3N2/2013, a crystal structure exactly matching the one present in the IIV was found and selected for analysis [PDB code: 6PDX] (Qiu et al., 2020). Possible mimotopes localization from phages peptide sequences was run on Episearch server against whether 3M6S, 6PDX, and 4FQM and all mimotopes predicted were filtered first by high score and containing amino acids falling into the antigenic regions. Remaining mimotope predictions presenting steric impediment to Ab binding due to localization on the inner part of HA 3D structure were discarded and the solution with the greatest number of amino acids coincidences within the HA antigenic regions and highest score was chosen as the most probable mimotope within Influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2, and Influenza B 3D structures.

2.9. Statistics

For individual mice class/subclass-Ab titers, sera micro-neutralization titers and the percentage of anti-globular region IgG Abs

Table 1
Adjuvants promote a differential class/subclass Ab response against IIV.

	Mean class and subclass-specific antibodies					
	IIV	IIV +				
		Sap	GK-1	IFA	AddaVax	Al(OH) ₃
IgG1	6.91 ± 2.00	6.56 ± 3.41	2.13 ± 0.32	56.01 ± 24.80 *	7.60 ± 1.21	15.98 ± 10.31
IgG2a	1.88 ± 0.49	1.38 ± 0.22	1.16 ± 0.08	16.64 ± 3.44 **	11.76 ± 5.49	1.27 ± 0.25
IgG2b	2.54 ± 0.45	1.96 ± 0.37	1.51 ± 0.16	10.41 ± 1.18 **	5.52 ± 1.38 *	1.99 ± 0.38
IgM	3.07 ± 0.53	3.49 ± 0.32	3.17 ± 0.23	6.24 ± 1.36 *	3.75 ± 0.63	3.15 ± 0.29

Mean antibody titers ± SD for IgG1, 2a, 2b, and M were determined 75 days after a single dose of the IIV alone or coadministered with a panel of different adjuvants. P values * < 0.005, ** < 0.0001.

relative to anti HA IgG Abs, an ordinary one-way ANOVA followed by a Dunnett’s multiple comparison post hoc test of each IIV + adjuvant group against the IIV alone group was employed using GraphPad Prism 7.00 software.

3. Results

3.1. Anti-IIV Ab titers and anti-Influenza A virus microneutralization titers

Anti-IIV Ab titers from individual mice were measured by ELISA at day 45 after vaccination and mean titers per group are shown in Table 1. Mice inoculated with IIV + IFA reached higher IgG1 Ab titers followed by IIV + AddaVax and IIV + Al(OH)₃ whereas for IgG2a, IIV + AddaVax and IIV + Al(OH)₃ raised this subclass titers significantly followed by IIV + IFA. For IgG2b, also IIV + IFA induced high titers of this subclass followed by IIV + AddaVax and IIV + Al(OH)₃. IIV + Sap and IIV + GK-1 didn’t raise IgG1, IgG2a or IgG2b Ab titers when compared to unadjuvanted IIV (Table 1). After 45 days of a single dose of IIV, the main group which showed statistically significant IgM levels was the IIV + IFA. To a lesser extent, IIV + Addavax IgG2b show statistical difference in comparison with IIV group.

3.2. Anti-Influenza sera pools’ microneutralization activity

Sera pools from all groups were tested for their neutralization activity against Influenza A H1N1 pdm09 virus infection to cell cultures

and their microneutralization titers were determined (Fig. 1A). IIV + Sap serum had the highest microneutralization titer followed by IIV + GK-1 and IIV + AddaVax in decreasing order when compared to IIV group. IIV + IFA had the same neutralization activity as IIV serum which was smaller compared to all other groups. Fig. 1B shows representative images of the microneutralization activity of a sera at a neutralizing dilution (center) and the following non-neutralizing dilution (right).

3.3. Reactivity and sequencing of positively selected RPL phage clones

From the third selection round of the RPL with sera pools from experimental groups, phages’ concentrations were titered and fifteen colonies per experimental group were randomly selected, amplified, purified, and their reactivity against the serum used for their panning was tested by ELISA (Fig. 2). A serum pool from non-vaccinated mice was used as negative control to establish a threshold value per group (dashed line) as described in Materials and Methods. A total of 24 reactive clones were selected, amplified, and sequenced (Table 2) along with their frequency of isolation. Five clones were recognized by the sera of mice immunized with IIV only. These five clones were also recognized by all groups immunized with IIV plus the different adjuvants. Twelve additional epitopes were recognized by sera from the group immunized IIV + GK-1, one of them was recognized twice. Four and three additional clones were recognized by sera from IIV + IFA and IIV + Al(OH)₃ groups, respectively (Table 2). All positive clones were re-assayed to confirm their reactivity and specificity and rule out false-positives. Only one clone per group from IIV + GK-1, IIV + IFA, and IIV + Al(OH)₃ was isolated twice.

3.4. Mimotope localization through episearch server

Alignment with two different algorithms (Clustal Omega and MultAlin) showed no direct sequence homology between any of the proteins from the Influenza strains present in the employed vaccine and the phages’ peptides (data not shown). Some amino acids aligned but there was no conserved homology between them. This suggests that all sequenced phage clones express conformational mimotopes, i. e. 3D amino acid structures different to Influenza’s antigens on their sequences but with similar binding capabilities to anti-Influenza vaccine’s Abs. This allows mimotopes expressed on phage’s capsid to be effectively panned by Abs as if they were the original Ag. Therefore, peptides from positive clones were compared against chosen crystals of Influenza A and Influenza B through Episearch server.

In order to find the best mimotopes, as a starting point, we

A) Serum pools microneutralization titers from mice vaccinated with:

Saline	IIV	IIV +				
		Sap	GK-1	IFA	AddaVax	Al(OH) ₃
<1:400	1:800	1:3200 **	1:1600 *	1:400	1:1600 *	1:800

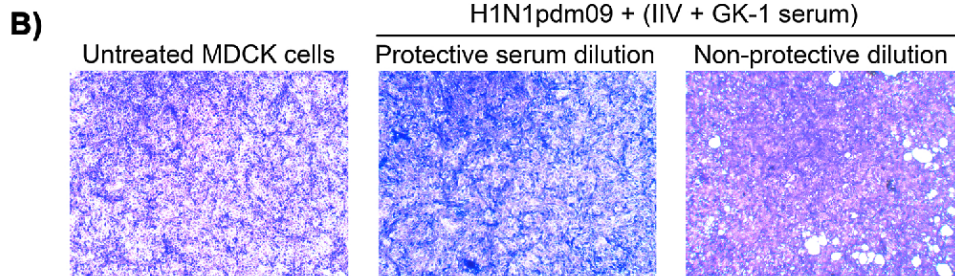


Fig. 1. Different adjuvants and IIV promote differential microneutralization activities. A) Sera pools from all groups were tested for their neutralization activity against Influenza A H1N1pdm09 virus infection to cell cultures and their microneutralization titers were determined and expressed as the inverse of last serum dilution where no cytopathic effect was observed. P values compared to IIV group. * < 0.05, ** < 0.0001. B) Representative 10X optical microscopy photographs of fixed and crystal violet stained MDCK cells pretreated with culture media only (left), with an effectively neutralized-Influenza A H1N1pdm09 inoculum plus a protective serum dilution (center) or virus inoculum plus a non-protective serum dilution (right).

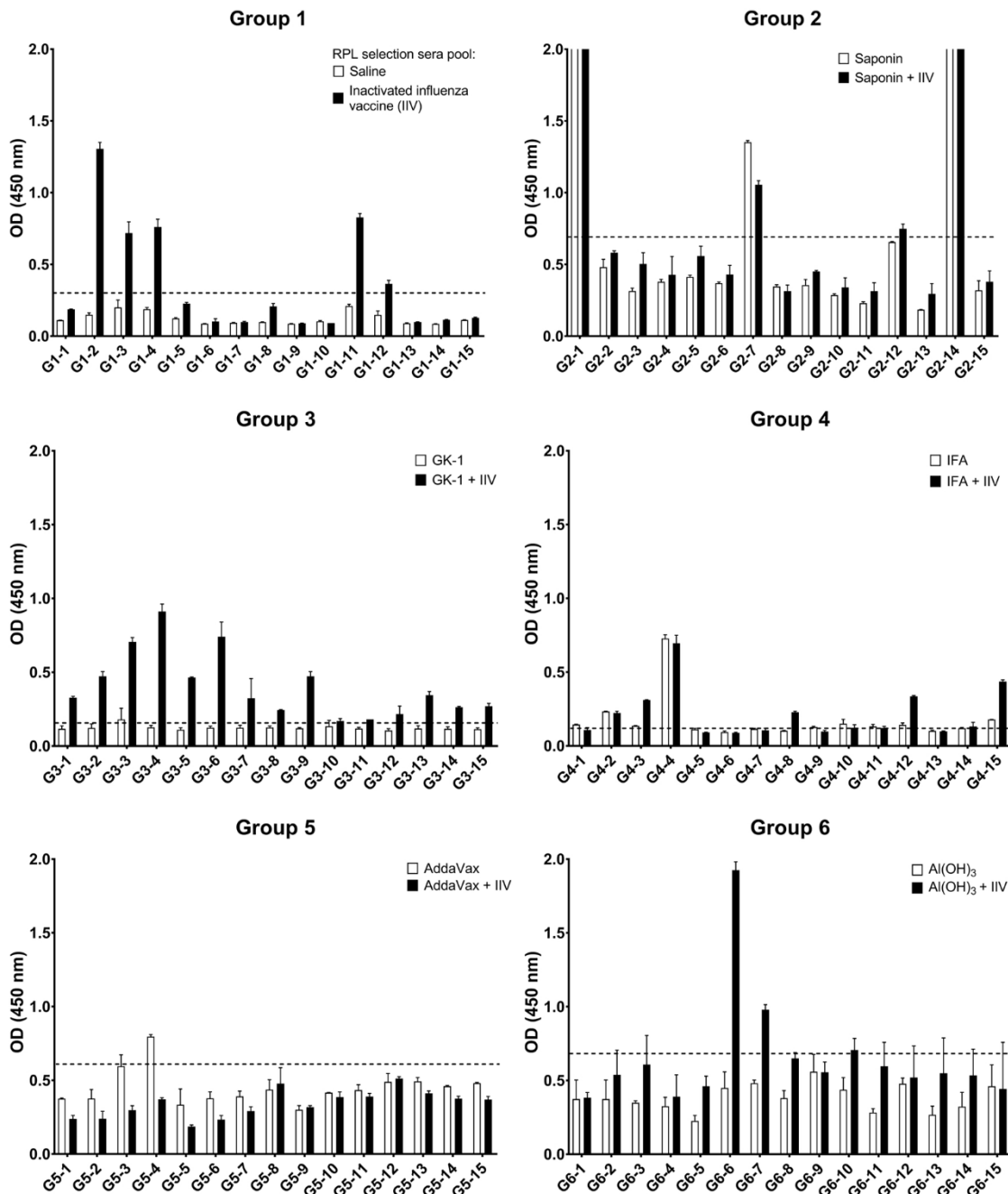


Fig. 2. Random phage clones' reactivity against vaccinated serum pool.

After three selection rounds, random phage colonies per group were amplified, purified, and their individual reactivity was tested by ELISA against the serum used for their biopanning. White bars represent reactivity against a sera pool from animals vaccinated with the adjuvant (or saline) without IIV and black bars represent reactivity against sera pool from animals vaccinated with inactivated Influenza vaccine (IIV) plus the respective adjuvant. Dashed lines represent the mean + 3 SD of the of the adjuvant-only (or saline) serum pool in the experimental group as a positivity threshold. Inactivated Influenza vaccine (IIV), Incomplete Freund's Adjuvant (IFA).

considered the score level (0.8 to 1) for each peptide, secondly, the mimotope localization within the antigenic region (globular head), and exposure on the surface of the protein. Most of the mimotopes had fully exposed sequences, but others had a variable number of internalized amino acids, which can be considered sterically hindered. We determined which amino acids were exposed and which were internalized for the three HA crystals. From that analysis, we marked for each Episearch solution the internalized and exposed amino acids and calculate the ratio of internalized / exposed and transform it into exposure percentage. A percentage equal or greater than 51 % was considered exposed

while values equal or lower than 50 % were considered internalized. Percentages of exposed mimotopes were as follows: A-H1N1 89 %, influenza B 86 % and A-H3N2 82 %. The mimotopes that can be considered sterically hindered (impossible) were: A-H1N1 11 %, influenza B 14 % and A-H3N2 18 %. This analysis strengthens our reliability on Episearch server solution since most of them are sterically viable in all three strains.

Amino acids from the best prediction per peptide were merged in the different HA structure per group and highlighted as colored spheres (amino acids different from Influenza's antigenic sites in yellow or the

Table 2
Positive phages clones' peptide sequence and isolation frequency.

Group 1. IIV		Group 4. IIV + IFA	
Sequence	Frequency	Sequence	Frequency
QPYWYPF	1/5	VSMSHRA	2/4
SELPLGY	1/5	HSISHRA	1/4
TANSPSH	1/5	TTLSHRA	1/4
HSLLYLH	1/5		
LDLFRPLY	1/5		
Group 3. IIV + GK-1		Group 6. IIV + Al(OH) ₃	
Sequence	Frequency	Sequence	Frequency
ADARYKS	1/12	LMRPSDR	2/3
NQTAGHR	2/12	GNSAWPP	1/3
VGNLAFR	1/12		
GSTSESK	1/12		
SVENSWN	1/12		
NDYYFKP	1/12		
SLQDDAY	1/12		
STLTVTS	1/12		
NTQVLNR	1/12		
SSMPWDH	1/12		
MPRIPPA	1/12		

Deduced sequence of the expressed peptide on positive selected phage clones that reacted above the threshold line with the serum pool from mice vaccinated with IIV + adjuvant but not the group's control serum.

different colors for the different antigenic sites, Fig. 3A).

For the IIV alone group, many mimotopes recognize the globular head and the stalk regions as Fig. 3 shows, contrary to all the other IIV + adjuvants groups where many of the mimotopes recognize the globular head and very few recognize the stalk region (none for the case of adjuvanted H3N2 solutions). Mainly, IIV + adjuvant groups [AIF, GK-1, and Al(OH)₃] focus the immune response against the globular head and many mimotopes recognize amino acids belonging to multiple antigenic sites.

Fig. 3B depicts the ratios between the Influenza B HA globular head and whole vaccine show that most IgG Abs from the IIV + IFA group are targeted against HA globular head (70 %), whereas IIV + GK-1 and IIV + Al(OH)₃ show a lower proportion (19.9 and 22 % respectively).

4. Discussion

The aim of the present study was to explore the antibody response induced by the immunization of mice with the IIV alone or combined with different widely used adjuvants and GK-1, an experimental immunomodulator recently proposed by our research group as an Influenza vaccine adjuvant (Segura-Velazquez et al., 2009, 2006). Al(OH)₃ was included since it's the first adjuvant historically used and approved for human use (Glenny et al., 1931) whereas saponin is a commonly used veterinary adjuvant (Burakova et al., 2018). The extensively used IFA and AddaVax (a commercial MF59 analog) adjuvants were also included. Both create water-in-oil emulsions with the antigen which favors slow release prolonging antigen's permanence in the body (Burakova et al., 2018; Egli et al., 2014; McKee and Marrack, 2017).

In this study, the employed adjuvants differentially affected the titers of antibody subclasses. IFA, AddaVax, and Al(OH)₃ importantly increased the three different subclasses albeit to different extent while IgM levels were increased only by IFA (Table 1). Other studies report IIV induces an equilibrated Th1/Th2 response characterized by similar IgG2a and IgG21 titers (Hauge et al., 2007; Hovden et al., 2005) whereas IIV + IFA and IIV + Al(OH)₃ elicits high IgG1 and lower IgG2a Ab titers which is characteristic of a Th2 response (Hjertner et al., 2018; Proietti et al., 2002). Seventy-five days after a single dose of IIV, it was observed higher IgG1 Ab levels compatible with a higher Th2 response. The IIV + IFA group showed a mixed Th1/Th2 response characterized by IgG2a and IgG1 Abs titers, respectively, with higher IgG1 Abs indicating a mild

polarization towards a Th1 response. IIV + AddaVax induced a mixed Th1/Th2 response with slightly higher IgG2a Ab titers indicating modest polarization towards a Th1 response whereas IIV + Al(OH)₃ group showed higher IgG1 Abs indicating a preferential Th2 response. Lastly, IFA and AddaVax exhibited increased anti-IIV IgG2b Abs titers in comparison with the IIV alone group.

Although usually a viral infection triggers a Th1 response characterized by cytotoxic lymphocytes and macrophages recruitment critical for viral clearance, a long-term immunity (and preferably life-long) is conferred by efficient neutralizing Abs. Thus, an efficient immune response is such a mixture of cytotoxic cells and long-lived B cells that could be favored by the use of adjuvants. Our results confirm that immune responses are modulated by the adjuvant of choice and this should be considered for vaccine research.

Antibodies quantities are usually the reference standard to define a vaccine's efficacy. However, other properties such as affinity/avidity, isotypes induced or recognized epitopes are also very important and may affect their neutralizing activity (Kenney et al., 1989; Khurana et al., 2010).

Neutralization experiments, which could be considered as a measure of the effectiveness of the antibodies elicited, show that sera with the highest IgG subclasses levels are not necessary those with the higher effector activity. The high levels of IgG subclasses induced in the IIV + AddaVax group correlate with their higher neutralizing titers while the ones induced using Al(OH)₃ and IFA titers don't. Despite the high levels of Abs found in the IIV + IFA group, they induce a low neutralization titer that could be due to a low affinity of Abs induced. In contrast, albeit GK-1 does not increase the IgG levels, they double neutralization titers respect to the un-adjuvanted vaccine. These results could be consequence of the differential effect of the different adjuvants on the repertoire of Abs specificities. Adjuvants, among other effects on the immune system, can affect the cytokine environment at the inoculation site having impact on the recruited cells and/or the maturation of a particular population ultimately affecting the immunological outcome. For example, after immunization, a Th1 signaling induces IFN- γ secretion so as other Th1-related cytokines which in turn increases IgG2a production and cytotoxic lymphocytes, NK cells and macrophages recruitment inhibiting IgG1 production. On the other hand, a Th2 signaling induces IL-4 secretion causing isotype class-switch leading to increase IgG1 production (Szyszko et al., 2006). The effect on the immune response can be strongly influenced by adjuvants and the mechanisms behind how these molecules influence the type of immune response, the Ab specificity, and their affinity/avidity are poorly understood (Kenney et al., 1989). So far, what is known is that adjuvants are capable of influencing Ab's affinity against native or denaturalized antigens (Hui et al., 1991) so as to increase their affinity and extend the epitope recognition repertoire (Khurana et al., 2010, 2012; Khurana et al., 2011). Understanding mechanisms and applying such knowledge to vaccine development is a science area commonly referred as "rational vaccine design".

Herein, the induced Ab recognition repertoire was investigated using a peptide display library of 7 amino acids. This approach allows us to identify epitopes/mimotopes specifically recognized by the Abs elicited by the immunization of the combination of IIV with the five different adjuvants tested. Fifteen clones per group were randomly chosen in order to identify the most frequent epitopes/mimotopes from the universe of epitopes present in the IIV whether alone or coadministered with different adjuvants. This is a strategy commonly used to select peptides expressed on phage's surface that mimic natural epitopes, including conformational B-cell epitopes (Zhang et al., 2016). Five clones were selected using a serum pool from mice immunized with the unadjuvanted IIV. As expected, sequences expressed by these five clones were also recognized by all the sera pools from the other experimental groups immunized with IIV in combination with a different adjuvant (data not-shown). This means that, despite the differences in the selected clones' sequences between the experimental groups, all serum pools

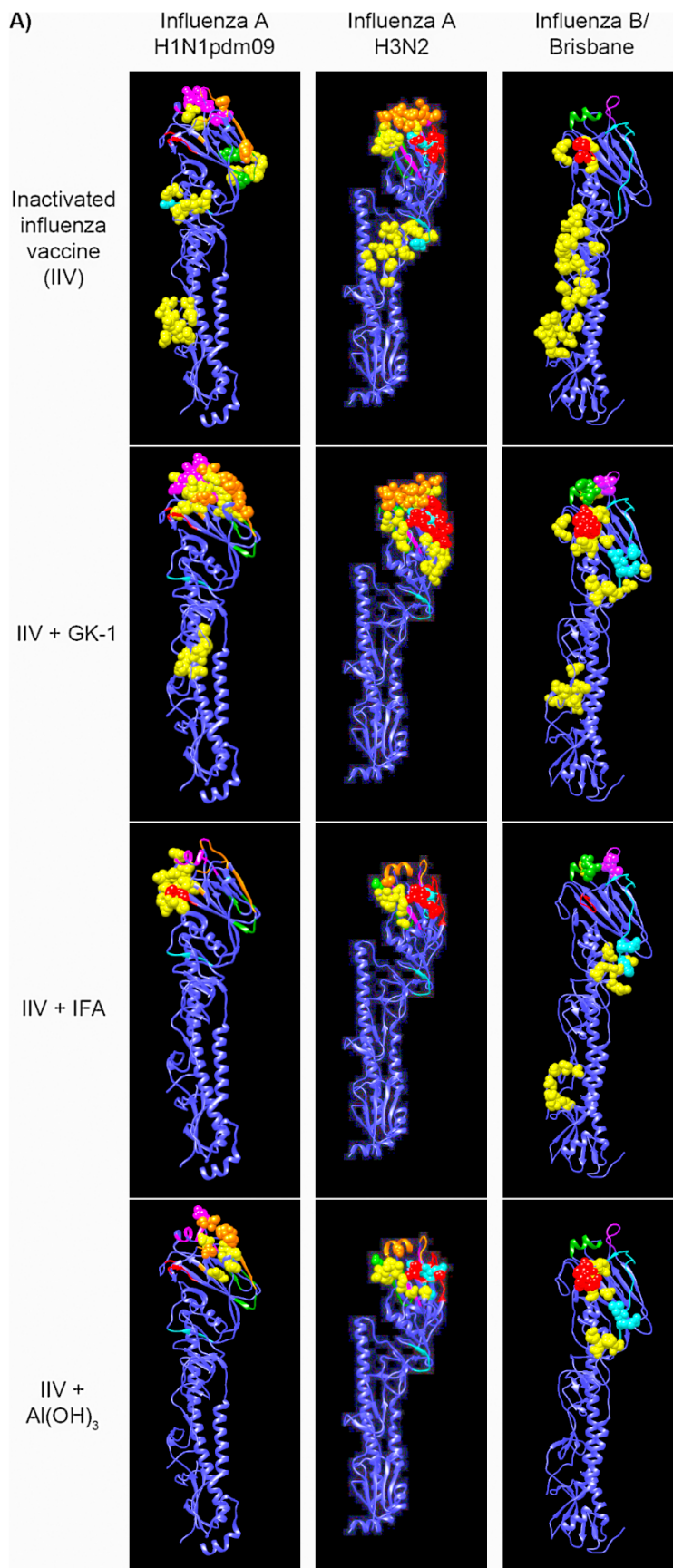


Fig. 3. Localization of possible mimotopes within Influenza hemagglutinin.

A) All peptide sequences from positively selected phage clones were run on Episearch against the crystal structure of hemagglutinin from Influenza A H1N1pdm09 and Influenza B/Brisbane. All best solutions per group for each peptide were localized, highlighted as spheres within the 3D crystal structure of the respective hemagglutinin, and merged together. Yellow spheres represent amino acids different from antigenic sites and the rest of colored regions represent different antigenic sites for all Influenza strains. B) Percentage of IgG Abs against the recombinant HA head vs. IgG Abs against the whole IIV. One way ANOVA with Dunnett's post hoc test compared to IIV group. *P* value * < 0.0001.

from IIV + adjuvant groups are capable of recognizing the same mimotopes from the unadjuvanted IIV group.

Once sequenced the positive panned clones, four and three clones were selected by the sera from the IIV + IFA and the IIV + Al(OH)₃ immunized groups respectively. Unexpectedly, thirteen out of the fifteen clones from the IIV + GK-1 group were reactive. It is worth to mention that some clones from the IIV + GK-1, IIV + IFA, and IIV + Al(OH)₃ were isolated twice in their experimental group increasing the strength of this method (Table 2).

All isolated clones expressed conformational mimotopes and they were searched by means on the EpiSearch server on the HA crystal structures from the three Influenza strains included in the IIV used. After mapping the most probable mimotope within the HA 3D structure of Influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2, and Influenza B for all phages' peptides, some mimotopes from the unadjuvanted IIV group recognize HA antigenic sites located on the globular head but many also recognize the stalk region in particular for Influenza B strain. Interestingly, ten out of eleven mimotopes from the IIV + GK-1 group recognize the HA head region for Influenza A H1N1pdm09. This could explain the higher neutralization capacity against Influenza A H1N1pdm09 strain shown in Fig. 1. Also, for Influenza B, the IIV + GK-1 mimotopes target multiple amino acids exclusively from globular head and most of them belong to antigenic sites and no mimotope recognize HA's stalk region. Our results show that IFA, GK-1, and Al(OH)₃ adjuvants polarize the mouse IIV Ab response mainly against the HA's globular head and specially to numerous amino acids from the antigenic sites and the receptor binding site. In order to consolidate our findings, we measured the percentage of antibodies induced against Influenza's HA globular head. As shown in Fig. 3B, Abs induced by the IIV + IFA, GK-1, and Al(OH)₃ increase the percentage of Abs recognizing Influenza B HA's globular head (70.90 %, 19.80 % and 22.26 % respectively). The highest increase was observed when coadministering IIV with IFA where most of the Abs induced are triggered selectively against HA globular head in the IIV. The lack of correlation between the HA globular head Abs and the neutralization assay might be consequence of the different strains employed in the microneutralization and head-to-total protein ratio values. Nevertheless, it would be interesting to know the mechanisms which mediate the important changes in Abs specificity mediated by IFA to the IIV in order to contribute to the adjuvant design and use.

The critical role of these HA's regions as targets for virus neutralization and their protection against infection has been established (Ni et al., 2013; Wang et al., 2008; Wiley et al., 1981; Wilson et al., 1981; Xu et al., 2010). Our observations are supported by similar results previously reported by Khurana et al., 2011, 2012 using Influenza vaccine adjuvanted with MF59. By means of an Influenza-specific whole-genome fragment phage display library, they report that sera from patients vaccinated with Al(OH)₃-adjuvanted IIV but especially the ones vaccinated with MF59-adjuvanted IIV, selected more phage clones that fall within the HA receptor binding site and surrounding amino acids indicating the presence of antibodies targeted to these critically important regions for Influenza virus neutralization. They refer to this phenomenon as an Ab repertoire expansion targeted to the HA protecting epitopes. Furthermore, when these adjuvants were used, patients produced antibodies that recognized other proteins such as Influenza's neuraminidase (Khurana et al., 2010).

It is important to mention that the high neutralizing activity of the antibodies induced by IIV + GK-1 vaccine may underlie its potential to improve the protection induced by IIV itself as previously reported (Segura-Velazquez et al., 2006). Thus, GK-1 may increase the repertoire of antibodies that may bind to the virus mediating its clearance. In addition, we have recently reported that GK-1 didn't show any toxic or mutagenic effects (Cervantes-Torres et al., 2019) making it a safe adjuvant candidate that could be added to the portfolio of new immunomodulatory molecules.

Lastly, when aligning each identified mimotope from Influenza A H1N1pdm09, influenza A H3N2, and Influenza B 3D structures between

Table 3
Comparison of EpiSearch solution patch within Influenza A H1N1pdm09, Influenza A H3N2, and Influenza B.

Input peptide sequence	Influenza strain	Recognized patch within Influenza crystal
Group 1. IIV		
QPYWYYPF	A/ H1N1pdm09	P159, Q189, Q193, Y198, P212
	A/H3N2	F125, W127, Q132 , W153, Y161, P162, Q197 P31, P305, Y306, W321, P325
	B	Y165, E172, S204, Y206, L233, E235, P236, G237
SELPLGY	A/ H1N1pdm09	S47, G49 , E50, S54, P55, G275, S279, E280, P289, Y302, G303
	A/H3N2	P70, S140, G141, P144, G149, G151, G235, G236, L237
	B	H8, A9, N10, N11, S12, T13, T15, T25, H28, S29, N320, P322
TANSPSH	A/ H1N1pdm09	T40, N45, S46, S47, S279, N285, P289, N290, P293, N296, N298, T301, S312, T313
	A/H3N2	T8, S9, S10, N11, S12, P13, H14, N25, T27, A329, N330, T332
	B	L50, H51, S83, S84, S85, I265, I267, S268
HSLIYLH	A/ H1N1pdm09	S136, H156, L157, S159, Y161, H184, I192, L194, S198, I217
	A/H3N2	S39, H40, L44, H85, S283, L284, L286, I287, Y297, L300
	B	P159, L191, D196, Y198, P212
LDFRPLY	A/ H1N1pdm09	D188, D190, F193, L194, R220, P221, R222, D225, P227, R229
	A/H3N2	P31, L32, P36, L300, P305, Y306, P325
	B	
Group 3. IIV + GK-1		
ADARYKS	A/ H1N1pdm09	K153, S157, K160, A195, D196, Y198
	A/H3N2	S95, Y100, S136, S137, S138, R140, R141, S145, S146, R222, R224, D225, R229
	B	K164, A166, A199, K200, D204, S205, K206
NQTAGHR	A/ H1N1pdm09	N125, G155, N156, Q189, Q193, N194, A195, T245
	A/H3N2	N126, A128, G129, T131, Q132, N133, G134, T155, H156, N158, A163, A196, Q197, T248
	B	R69, G138, T139, G141, N145, T147, N148, G149, N150, G151, A154
VGNLAFR	A/ H1N1pdm09	K160, S162, K163, S164, F200, K209, T241, T245
	A/H3N2	F125, N126, A128, G129, V130, N133, G134, L157, N158, A163, L194, A196
	B	N145, N148, G149, ——— N150, G151, F152, G235, G236, L237
GSTSESK	A/ H1N1pdm09	K160, S162, K163, S164, F200, K209, T241, T245
	A/H3N2	T131, G13, T13, S13, T15, S15, T18, K18, F193, S198
	B	S140, N145, N148, N150, W158
SVENSWN	A/ H1N1pdm09	S128, N129, V132, W150, V152, S190 S140, N145, N148, N150, W158
	A/H3N2	N121, N122, E123, S124, N126, W127, N165, N171, E172, S205
	B	S140, N145, N148, N150, W158
NDYYFKP	A/ H1N1pdm09	N125, D127, K130, K153, K154, N156, P159, N194
	A/H3N2	F79, N81, K82, K83, F120, N121, N122, F174, Y257
	B	P70, K71, P144, N145, N148, N150, 152
SLQDDAY	A/ H1N1pdm09	S185, A186, D187, Q189, S190, L191, Q193, A195
	A/H3N2	S159, Y161, D188, D190, L194, A196, Q197, S198, S199
	B	A166, Q197, A199, L201, D204, S205
STLTVTS	A/ H1N1pdm09	S128, V132, T133, V152, L191
	A/H3N2	V130, T131, T135, S136, T155, L157, S159, V186, T187, L194, S198
	B	

(continued on next page)

Table 3 (continued)

Input peptide sequence	Influenza strain	Recognized patch within Influenza crystal
NTQVLNR	B	S78, L19, T121, T179, S274
	A/ H1N1pdm09	N125, V152 , N156, Q189 , L191, Q193, N194
	A/H3N2	N126, V130, T131, Q132 , N133, T155, L157, N158, L194 , Q197, T248
	B	V15, V16, T18, Q21 , V24, N25, V29, L326, L328 , N330
SSMPWDH	A/ H1N1pdm09	W123, P124, D127, S128, S157 , P159
	A/H3N2	P74, D77, S136, S137 , S138, S143, S145, S146 , S149, W153
MPRLPPA	B	P70, S140 , P144, W158
	A/ H1N1pdm09	L32, L290, P291 , P304, L312 , R313, L314
	A/H3N2	A128, L157, P162 , A163, L194 , A196, R201
	B	R50, P55, P77 , R118, L119
Group 4. IIV + AIF		
VSMSHRA	A/ H1N1pdm09	V132, A134, H138 , A139, A141 , S143, R221
	A/H3N2	S136, S137, S138, S145, H184, V186 , S219, R220, R222 , R224, R229
	B	S9, S10, S12, H14, V29, A329, R335
	A/H1N1	H181, S183, S185 , A186, I214 , A215, I216, R217 , R226
HSISHRA	A/H3N2	S136, S137, S138 , S145, H184, S219 , R220, R222, I223 , R224, I226, R229
	B	R50, I76, S78 , R80, H116 , R118, S274
	A/ H1N1pdm09	T133, A134 , H138, A139, A141, S143, R221
	A/H3N2	S95, T135 , S136, S137, S138, R140, R141, S145, S146, R222 , R224, R229
TTLSHRA	B	T165 , A166, T167, A199 , L201, S205
Group 6. IIV + Al(OH) ₃		
LMRPSDR	A/ H1N1pdm09	P118, S121, P124, D127, S128, R252
	A/H3N2	S136, S137, S138 , S145, D190, S219, R220 , P221, R222, R224, D225, P227, R229
	B	R50, P55, P77, S78, R118 , L119
	A/ H1N1pdm09	W123, P124, N125 , S128, G155 , N156, S157, P159
GNSAWPP	A/H3N2	P74, N96 , N133, G134, S136, S137 , S138, G142, S143, N144, S145, S146, S149, W153
		P70, G138, S140 , G141, P144 , N145, N148, G149, N150, G151, A154, W158
	B	

Solutions from Influenza A and Influenza B mimotopes were aligned in their sequence in order to determine fully or highly conserved residues due to chemical properties of the lateral chain.

strains' solutions from Episearch, several amino acids match for every solution set (Table 3, bold italic characters) suggesting a potential cross protection between them although this observation deserves careful additional research.

In summary, this study further describes the contribution of different adjuvants to the antibody response against Influenza vaccine challenge. This information may contribute to the knowledge required to combine different adjuvant to improve vaccine efficiency against this challenging infectious disease (Garcon and Di Pasquale, 2017).

Ethical approval

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

Funding

Juan Voutssas-Lara (MSc) is a doctoral student from Programa de

Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received fellowship 260773 / 577065 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) México. This article forms part of his doctoral thesis.

This study was supported by the institutional program “Programa de Investigación para el Desarrollo y la Optimización de Vacunas, Inmunomoduladores y Métodos Diagnósticos del IIB” (PROVACADI) and CONACyT (grant number 253891).

Declaration of Competing Interest

The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this article.

Acknowledgements

We thank the Unidad de Modelos Biológicos from the Instituto de Investigaciones Biomédicas for their support on the animal care, to Dr. Gonzalo Acero for the expert advice for phage display libraries screening, to Dr. Patricia de la Torre for the DNA purification guidance and sequencing, Dr. Juan Garza-Ramos (PRONABIVE, México) for reagent donations, and Dr. Carlos Cabello Gutierrez from Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias for kindly providing us with the Influenza A H1N1pdm09 virus. We greatly acknowledge to Universidad Nacional Autónoma de México and CONACyT for the funding provided for developing this project.

References

Balkovic, E.S., Florack, J.A., Six, H.R., 1987. Immunoglobulin G subclass antibody responses of mice to influenza virus antigens given in different forms. *Antiviral Res.* 8, 151–160.

Benne, C.A., Harmsen, M., van der Graaff, W., Verheul, A.F., Snippe, H., Kraaijeveld, C. A., 1997. Influenza virus neutralizing antibodies and IgG isotype profiles after immunization of mice with influenza A subunit vaccine using various adjuvants. *Vaccine* 15, 1039–1044.

Burakova, Y., Madera, R., McVey, S., Schlup, J.R., Shi, J., 2018. Adjuvants for animal vaccines. *Viral Immunol.* 31, 11–22.

Burny, W., Callegaro, A., Bechtold, V., Clement, F., Delhay, S., Fissette, L., Janssens, M., Leroux-Rodé, G., Marchant, A., van den Berg, R.A., Garçon, N., van der Most, R., Didierlaurent, A.M., Group, E.C.R.S., 2017. Different adjuvants induce common innate pathways that are associated with enhanced adaptive responses against a model antigen in humans. *Front. Immunol.* 8, 943.

Cervantes-Torres, J., Gracia-Mora, I., Segura-Velazquez, R., Montero-Montoya, R., Espinosa-Aguirre, J. M., E.G. Camacho-Carranza, R., Rivera-Huerta, M., Sanchez-Bartez, F., Tinoco-Mendez, M., Ostrosky-Wegman, P., Fragoso, G., Sciuotto, E., 2019. Preclinical evidences of safety of a new synthetic adjuvant to formulate with the influenza human vaccine: absence of subchronic toxicity and mutagenicity. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 41, 140–149.

Cherian, T., Okwo-Bele, J.M., 2014. The decade of vaccines global vaccine action plan: shaping immunization programmes in the current decade. *Expert Rev. Vaccines* 13, 573–575.

Chung, K.Y., Coyle, E.M., Jani, D., King, L.R., Bhardwaj, R., Fries, L., Smith, G., Glenn, G., Golding, H., Khurana, S., 2015. ISCOMATRIX adjuvant promotes epitope spreading and antibody affinity maturation of influenza A H7N9 virus like particle vaccine that correlate with virus neutralization in humans. *Vaccine* 33, 3953–3962.

Ciabattini, A., Pettini, E., Fiorino, F., Pastore, G., Andersen, P., Pozzi, G., Medaglini, D., 2016. Modulation of primary immune response by different vaccine adjuvants. *Front. Immunol.* 7, 427.

Corpet, F., 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881–10890.

Cruz-Valdez, A., Valdez-Zapata, G., Patel, S.S., Castelli, F.V., Garcia, M.G., Jansen, W.T., Arora, A.K., Heijnen, E., 2018. MF59-adjuvanted influenza vaccine (FLJAD(R)) elicits higher immune responses than a non-adjuvanted influenza vaccine (Fluzone (R)): a randomized, multicenter, Phase III pediatric trial in Mexico. *Hum. Vaccin. Immunother.* 14, 386–395.

Deans, G.D., Stiver, H.G., McElhaney, J.E., 2010. Influenza vaccines provide diminished protection but are cost-saving in older adults. *J. Intern. Med.* 267, 220–227.

Egli, A., Santer, D., Barakat, K., Zand, M., Levin, A., Vollmer, M., Weisser, M., Khanna, N., Kumar, D., Tyrrell, L., Houghton, M., Bategay, M., O’Shea, D., 2014. Vaccine adjuvants—understanding molecular mechanisms to improve vaccines. *Swiss Med.* 144, w13940.

Federici, C., Cavazza, M., Costa, F., Jommi, C., 2018. Health care costs of influenza-related episodes in high income countries: a systematic review. *PLoS One* 13, e0202787.

Garçon, N., Di Pasquale, A., 2017. From discovery to licensure, the Adjuvant System story. *Hum. Vaccin. Immunother.* 13, 19–33.

- Ghimire, T.R., 2015. The mechanisms of action of vaccines containing aluminum adjuvants: an in vitro vs in vivo paradigm. *SpringerPlus* 4, 181.
- Glenny, A.T., Buttle, G.A.H., Stevens, M.F., 1931. Rate of disappearance of diphtheria toxoid injected into rabbits and guinea-pigs: toxoid precipitated with alum. *J. Pathol. Bacteriol.* 34, 267–275.
- Gulati, U., Kumari, K., Wu, W., Keitel, W.A., Air, G.M., 2005. Amount and avidity of serum antibodies against native glycoproteins and denatured virus after repeated influenza whole-virus vaccination. *Vaccine* 23, 1414–1425.
- Hauge, S., Madhun, A.S., Cox, R.J., Brokstad, K.A., Haaheim, L.R., 2007. A comparison of the humoral and cellular immune responses at different immunological sites after split influenza virus vaccination of mice. *Scand. J. Immunol.* 65, 14–21.
- Hjertner, B., Bengtsson, T., Morein, B., Paulie, S., Fossum, C., 2018. A novel adjuvant G3 induces both Th1 and Th2 related immune responses in mice after immunization with a trivalent inactivated split-virion influenza vaccine. *Vaccine* 36, 3340–3344.
- Hovden, A.O., Cox, R.J., Haaheim, L.R., 2005. Whole influenza virus vaccine is more immunogenic than split influenza virus vaccine and induces primarily an IgG2a response in BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.* 62, 36–44.
- Hui, G.S., Chang, S.P., Gibson, H., Hashimoto, A., Hashiro, C., Barr, P.J., Kotani, S., 1991. Influence of adjuvants on the antibody specificity to the Plasmodium falciparum major merozoite surface protein, gp195. *J. Immunol.* 147, 3935–3941.
- Julkunen, L., Hovi, T., Seppala, I., Mäkelä, O., 1985. Immunoglobulin G subclass antibody responses in influenza A and parainfluenza type 1 virus infections. *Clin. Exp. Immunol.* 60, 130–138.
- Kawaoka, Y., Neumann, G., 2012. *Influenza Virus: Methods and Protocols*. Humana, Totowa, N.J.
- Kenney, J.S., Hughes, B.W., Masada, M.P., Allison, A.C., 1989. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. Immunol. Methods* 121, 157–166.
- Khurana, S., Chearwae, W., Castellino, F., Manischewitz, J., King, L.R., Honorkiewicz, A., Rock, M.T., Edwards, K.M., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Golding, H., 2010. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Sci. Transl. Med.* 2, 15ra15.
- Khurana, S., Verma, N., Yewdell, J.W., Hilbert, A.K., Castellino, F., Lattanzi, M., Del Giudice, G., Rappuoli, R., Golding, H., 2011. MF59 adjuvant enhances diversity and affinity of antibody-mediated immune response to pandemic influenza vaccines. *Sci. Transl. Med.* 3, 85ra48.
- Khurana, S., Verma, N., Talaat, K.R., Karron, R.A., Golding, H., 2012. Immune response following H1N1pdm09 vaccination: differences in antibody repertoire and avidity in young adults and elderly populations stratified by age and gender. *J. Infect. Dis.* 205, 610–620.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P., Tivey, A.R.N., Potter, S.C., Finn, R.D., Lopez, R., 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.*
- McKee, A.S., Marraek, P., 2017. Old and new adjuvants. *Curr. Opin. Immunol.* 47, 44–51.
- Moyer, T.J., Zmolek, A.C., Irvine, D.J., 2016. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J. Clin. Invest.* 126, 799–808.
- Negi, S.S., Braun, W., 2009. Automated detection of conformational epitopes using phage display Peptide sequences. *Bioinform. Biol. Insights* 3, 71–81.
- Ni, F., Kondrashkina, E., Wang, Q., 2013. Structural basis for the divergent evolution of influenza B virus hemagglutinin. *Virology* 446, 112–122.
- Pedersen, G.K., Hoschler, K., Oie Solbak, S.M., Bredholt, G., Pathirana, R.D., Afsar, A., Breakwell, L., Nostbakken, J.K., Raae, A.J., Brokstad, K.A., Sjursen, H., Zambon, M., Cox, R.J., 2014. Serum IgG titres, but not avidity, correlates with neutralizing antibody response after H5N1 vaccination. *Vaccine* 32, 4550–4557.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612.
- Proietti, E., Bracci, L., Puzelli, S., Di Pucchio, T., Sestili, P., De Vincenzi, E., Venditti, M., Capone, I., Seif, I., De Maeyer, E., Tough, D., Donatelli, I., Belardelli, F., 2002. Type I IFN as a natural adjuvant for a protective immune response: lessons from the influenza vaccine model. *J. Immunol.* 169, 375–383.
- Qiu, Y., Stegalkina, S., Zhang, J., Boudanova, E., Park, A., Zhou, Y., Prabakaran, P., Pougatcheva, S., Ustyugova, I.V., Vogel, T.U., Mundle, S.T., Oomen, R., Delagrave, S., Ross, T.M., Kleanthous, H., Qiu, H., 2020. Mapping of a novel H3-Specific broadly neutralizing monoclonal antibody targeting the hemagglutinin globular head isolated from an elite influenza virus-immunized donor exhibiting serological breadth. *J. Virol.* 94.
- Ramirez-Martinez, G., Cruz-Lagunas, A., Jimenez-Alvarez, L., Espinosa, E., Ortiz-Quintero, B., Santos-Mendoza, T., Herrera, M.T., Canche-Pool, E., Mendoza, C., Banales, J.L., Garcia-Moreno, S.A., Moran, J., Cabello, C., Orozco, L., Aguilar-Delfin, I., Hidalgo-Miranda, A., Romero, S., Suratt, B.T., Selman, M., Zuniga, J., 2013. Seasonal and pandemic influenza H1N1 viruses induce differential expression of SOCS-1 and RIG-I genes and cytokine/chemokine production in macrophages. *Cytokine* 62, 151–159.
- Schaffner, W., van Buynnder, P., McNeil, S., Osterhaus, A., 2018. Seasonal influenza immunisation: strategies for older adults. *Int. J. Clin. Pract.* 72, e13249.
- Segura-Velazquez, R., Perez-Torres, A., Rosas, G., Toledo, A., Restelli, M., Acosta, E., Corral, R., Rosetti, F., Fragoso, G., Grinstein, S., 2006. A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine* 24, 1073–1080.
- Segura-Velazquez, R., Fragoso, G., Sciutto, E., Sarukhan, A., 2009. Towards identification of the mechanisms of action of parasite-derived peptide GK1 on the immunogenicity of an influenza vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* 16, 1338–1343.
- Shi, S., Zhu, H., Xia, X., Liang, Z., Ma, X., Sun, B., 2019. Vaccine adjuvants: understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine* 37, 3167–3178.
- Spackman, E., 2012. *Animal Influenza Virus*, second edition.
- Spitaels, J., Roose, K., Saelens, X., 2016. Influenza and memory t cells: how to awake the force. *Vaccines (Basel)* 4.
- Szysko, E., Brokstad, K., Cox, R.J., Hovden, A.O., Madhun, A., Haaheim, L.R., 2006. Impact of influenza vaccine formulation with a detailed analysis of the cytokine response. *Scand. J. Immunol.* 64, 467–475.
- Tregoning, J.S., Russell, R.F., Kinnear, E., 2018. Adjuvanted influenza vaccines. *Hum. Vaccin. Immunother.* 14, 550–564.
- Wang, Q., Cheng, F., Lu, M., Tian, X., Ma, J., 2008. Crystal structure of unliganded influenza B virus hemagglutinin. *J. Virol.* 82, 3011–3020.
- WHO, 2013. **Global Vaccine Action Plan 2011–2020**. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data. https://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/GVAP_doc_2011_2020/en/.
- Wiley, D.C., Wilson, I.A., Skehel, J.J., 1981. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289, 373–378.
- Wilson, I.A., Skehel, J.J., Wiley, D.C., 1981. Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 289, 366–373.
- Xu, R., Ekiert, D.C., Krause, J.C., Hai, R., Crowe Jr., J.E., Wilson, I.A., 2010. Structural basis of preexisting immunity to the 2009 H1N1 pandemic influenza virus. *Science* 328, 357–360.
- Yam, K.K., Gupta, J., Allen, E.K., Burt, K.R., Beaulieu, E., Mallett, C.P., Burt, D.S., Ward, B.J., 2016. Comparison of AS03 and Alum on immune responses elicited by A/H3N2 split influenza vaccine in young, mature and aged BALB/c mice. *Vaccine* 34, 1444–1451.
- Zhang, C., Li, Y., Tang, W., Zhou, Z., Sun, P., Ma, Z., 2016. The relationship between B-cell epitope and mimotope sequences. *Protein Pept. Lett.* 23, 132–141.
- Zlatkovic, J., Tsochnikas, G., Jarmer, J., Koessl, C., Stiasny, K., Heinz, F.X., 2013. Aluminum hydroxide influences not only the extent but also the fine specificity and functional activity of antibody responses to tick-borne encephalitis virus in mice. *J. Virol.* 87, 12187–12195.
- Zuniga, J., Torres, M., Romo, J., Torres, D., Jimenez, L., Ramirez, G., Cruz, A., Espinosa, E., Herrera, T., Buendia, I., Ramirez-Venegas, A., Gonzalez, Y., Bobadilla, K., Hernandez, F., Garcia, J., Quinones-Falconi, F., Sada, E., Manjarrez, M. E., Cabello, C., Kawa, S., Zlotnik, A., Pardo, A., Selman, M., 2011. Inflammatory profiles in severe pneumonia associated with the pandemic influenza A/H1N1 virus isolated in Mexico city. *Autoimmunity* 44, 562–570.