

Performance aerodinámica y estabilidad de una formulación nebulizada de plasma hiperinmune de llama conteniendo anticuerpos anti-influenza tipo A H1N1.

CESCHAN, N.^{1,2,*}; PARREÑO, V.³; WIGDOROVITZ, A.³; RAMIREZ-RIGO M. V. ^{1,2}; PUNTEL, M.^{4,#}

*nceschan@plapiqui.edu.ar; #mpuntel@inibibb-conicet.gob.ar

(1) Planta Piloto de Ingeniería Química-Universidad Nacional del Sur (PLAPIQUI, UNS-CONICET); (2) Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (UNS); (3) INCUINTA, IVIT-CONICET, INTA; (4) Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB, UNS-CONICET).

INTRODUCCIÓN

Globalmente, el **virus influenza tipo A H1N1** se ha establecido en la población como virus estacional, con graves consecuencias para la salud humana. Debido a la capacidad que posee el virus de evolucionar continuamente, logrando evadir la respuesta inmune inducida por la vacunación y generando resistencia contra los fármacos antivirales, surge la necesidad de desarrollar nuevos agentes terapéuticos complementarios.

La transferencia de **anticuerpos específicos** (inmunidad pasiva) es una aproximación terapéutica que apunta a reforzar la respuesta inmunitaria específica del individuo contra el virus.

El **plasma inmune** específico contra H1N1 posee altos títulos de anticuerpos contra la hemaglutinina (HA) del virus. Una proporción de ellos posee actividad neutralizante que se ve asociada a protección contra la infección, bloqueando la entrada del virus a la célula, por lo que representa una **alternativa terapéutica de alto potencial**.

En **patologías respiratorias**, la administración local de agentes terapéuticos se puede lograr por medio de tecnologías de **nebulización** que presenta ventajas como la reducción significativa de la dosis y el tiempo de exposición sistémica¹.

Previamente, hemos descrito el fuerte efecto profiláctico producto de la administración intranasal de plasma inmune en el modelo murino de infección con virus influenza².

OBJETIVO

Estudiar el comportamiento aerodinámico y estabilidad del plasma hiperinmune de llama, nebulizado en un dispositivo tipo jet.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plasma inmune de llama obtenido luego de realizar un protocolo de hiper-inmunización, utilizando vacunas comerciales².

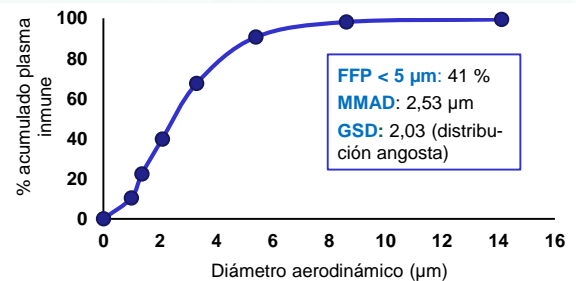
Desempeño aerodinámico de una formulación de plasma en buffer fosfato. 4mL de plasma inmune (dilución 1/4, en buffer fosfato, pH 7,4) se colocaron en la ampolla de un nebulizador jet. La ampolla de nebulización se conectó a un equipo de impacto en cascada multietapa. El nebulizador y la bomba de vacío del impactador se dejaron correr durante 15 minutos. El plasma depositado en cada sección del impactador y la ampolla, se recuperó con buffer fosfato pH 7,4 y se cuantificó mediante espectrofotometría UV-visible (280 nm) para la evaluación de los parámetros MMAD (mediana en masa del diámetro aerodinámico), GSD (desviación geométrica estándar), y FFP < 5µm (fracción fina de partículas < 5 µm).

Ensayos de inmuno-detección en fase líquida (ELISA) de HA0 recombinante. Para la evaluación de anticuerpos específicos contra virus influenza H1N1 se usaron placas de ELISA sensibilizadas con 0,5mg/mL de HA recombinante³. Sobre ellas se incubaron las fracciones con diluciones de plasma inmune, en duplicado. El pegado de anticuerpos a la HA se reveló con un antisuero anti-llama conjugado con peroxidasa (dilución 1/1000), que se evidenció mediante reacción colorimétrica por adición de 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS), en buffer citrato (pH 5,0). Se frenó la reacción con solución SDS 5%. La lectura del ensayo se realizó por absorbancia a 405 nm. Los resultados permitieron analizar la estabilidad relativa de los anticuerpos específicos en las muestras colectadas.

Financiamiento: CONICET, UNS, FONCYT.

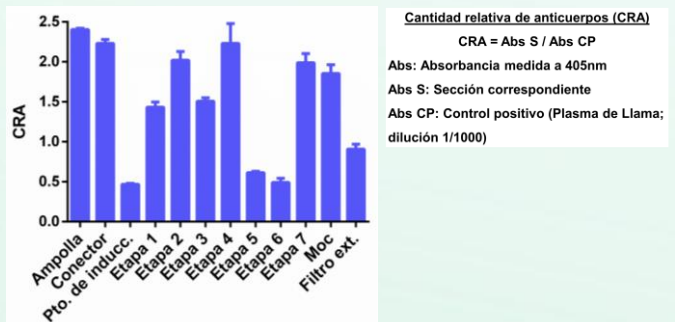
RESULTADOS

Figura 1. Porcentaje acumulado de plasma inmune determinado por cuantificación UV de las etapas de impactador.



• Los parámetros FFP, MMAD y GSD (Fig. 1) son adecuados para administración pulmonar mediante nebulización con tecnología jet.

Figura 2. Perfil de anticuerpos específicos contra HA, recuperadas a partir del lavado del nebulizador, el conector y las secciones del impactador.



• Alto grado de estabilidad de los anticuerpos del plasma frente al proceso de nebulización.

• Los valores de CRA para las etapas 3, 4, 7 y MOC (Fig. 2) muestran la abundancia de anticuerpos en partículas con tamaño aerodinámico < 5 µm, necesario para la administración local en epitelio pulmonar.

CONCLUSIONES

• Estos resultados preliminares muestran una buena performance aerodinámica de la formulación de plasma inmune en buffer fosfato, para su administración por nebulización. Sin embargo, los altos valores de CRA (>1) obtenidos en las secciones correspondientes a la ampolla y el conector, así como también en las etapas 1 y 2 podrían ser modificadas variando las condiciones de nebulización.

• La metodología usada para la detección de anticuerpos específicos en las secciones del impactador resultó adecuada.

• Nuevos ensayos de titulación de anticuerpos revelarán la abundancia absoluta de anticuerpos.

REFERENCIAS

- Ceschan N. E. et al. J Pharm Sci. 2020 Sep;109(9):2787-2797. doi: 10.1016/j.xphs.2020.05.027.
- Barbieri E. et al. PlosOne, 2021 (en revisión).
- Barbieri E. et al. Journal of Veterinary Healthcare, 2014 Jan-Mar;46(1):53-7. doi: 10.1016/S0325-7541(14)70049-5.