This project has received funding from the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 858247

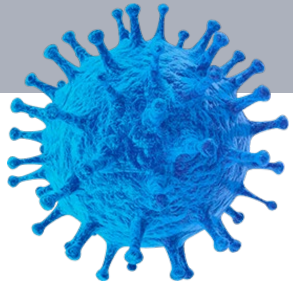
VLP-BVD
AQUILON

Nueva vacuna frente a BVD Basada en Virus-Like Particles

PARTE II: Resultados de pruebas experimentales

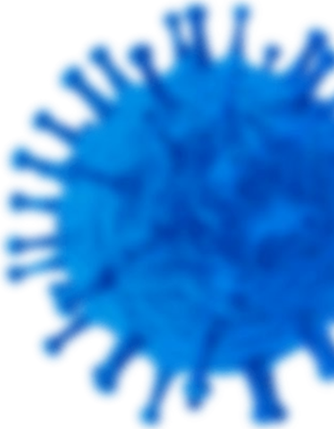
Ester Hevia, DVM
Gestión de proyecto BVD

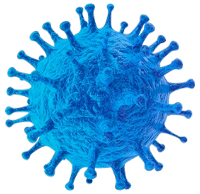
Introducción



- 1. Recordemos: Prototipos vacunales
  Diseño inicial → ¡¡Realidad!!
- 2. Candidatos: VLP-BVD quiméricas
- *3. Resultados ELISA*
  - *BVD total Ab*
  - *IBD-VP2*
  - *Péptidos reactivos*

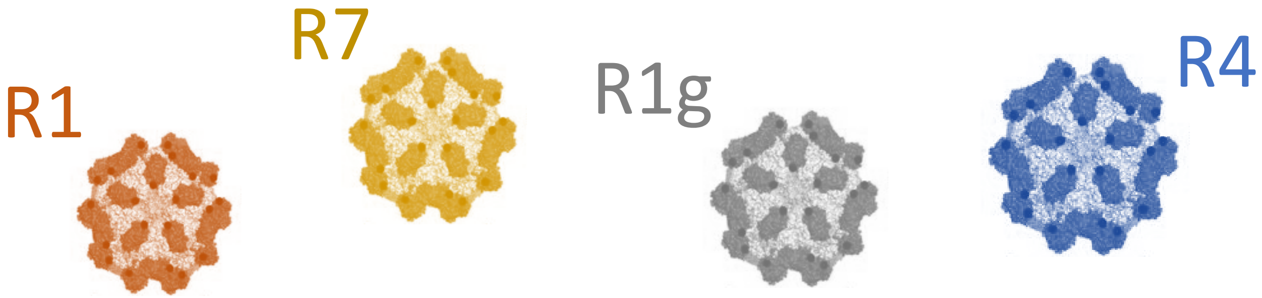
4. Resultados *ex vivo*





1. Recordemos: prototipos vacunales

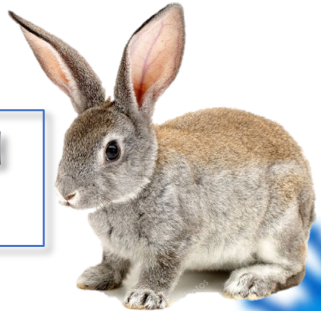
- Escogemos 3 candidatos chimeric VLP-BVD → Uso en estudios *in vivo* y *ex vivo*



1. Recordemos: Diseño inicial

1 Confirmación de la reactividad de un antígeno basado en Ch-VLP en un modelo *in vivo* (conejo)

2 Estudio de seguridad en conejo



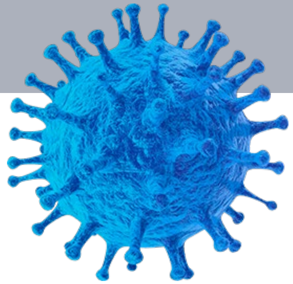
3 Selección de un prototipo vacunal en y establecimiento de prueba dosis-respuesta

4 Evaluación respuesta immune en ternero

5 Evaluación de seguridad y eficacia frente a desafío en especie de destino

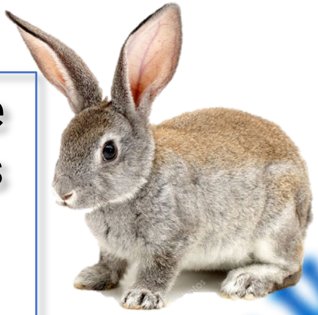
VLP-BVD
AQUILON

¡¡Realidad!!

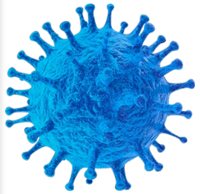


AQ06-01 Confirmación de la reactividad de un antígeno basado en Ch-VLP en especie de destino

AQ06-02 Evaluación de prototipos antigénicos de BoVLP-BVD en un modelo de conejo



AQ06-03 Evaluación de prototipos antigénicos de BoVLP-BVD y confirmación de la seguridad del uso de extractos no purificados en un modelo de conejo



AQ06-04 valoración de la citotoxicidad y producción de citoquinas ex vivo

AQ06-05 Evaluación dosis-respuesta del prototipo antigénico final BoVLP-BVD en conejos

AQ06-06 Evaluación del prototipo vacunal en terneros

VLP-BVD
AQUILON

¿Qué valoramos?

- Seroconversión: Anticuerpos totales frente a BVD
- ¿Vacuna marcada? IBD.VP2 del virus de Gumboro
- Detección de los péptidos: Elisa *in-house*
  - Péptido 99 (P99)
  - Péptido 35 (P35)

Seguridad

La realidad: AQ06-01

Barcelona, UAB

VLP-BVD
AQUILON

Diseño común: Experimentales

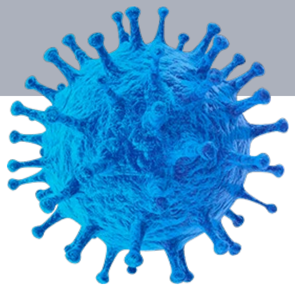
STUDY DAY	EVENT
D-7	Inclusion de los animales
D0	Sangrado Inoculación del prototipo/placebo
D7	Sangrado
D14	Sangrado Inoculación del prototipo/placebo
D21	Sangrado
D28	Sangrado
D35	Sangrado

-AQ06-02

-AQ06-03

-AQ06-05

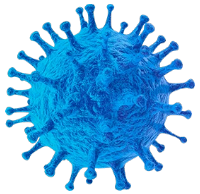
AQ06-02

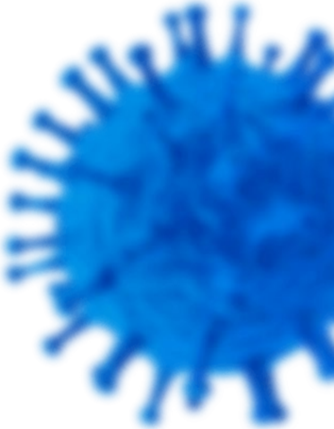


- Objetivo de la prueba:

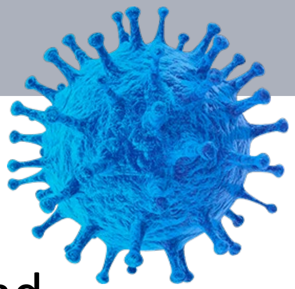
1. Reactividad de diferentes prototipos de BoVLP-BVD en un modelo de conejo ¿Es el conejo un modelo apropiado?
2. Confirmación de la reactividad Gumboro (VLP) en modelo de conejo

Prototipos
R1 (Péptido 99)
R1g (Péptido 99 + 5g)
R7 (P99 + P35)
C+ (Vacuna comercial inactivada)
C- (Placebo)





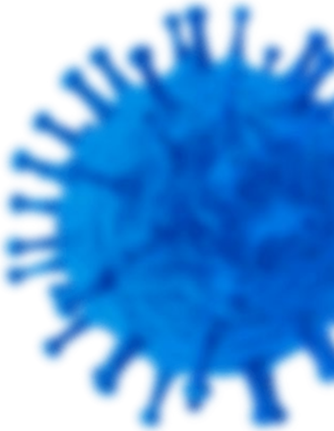
AQ06-03

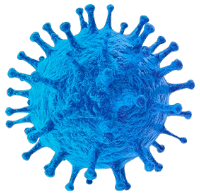


Objetivo de la prueba

1. Screening de prototipos antigénicos de VLP-BVD en términos de reactividad (confirmación de datos anteriores)
2. Confirmar la seguridad de los antígenos VLP-BVD purificados y no purificados
3. Evaluación de posibles adyuvantes para una formulación final

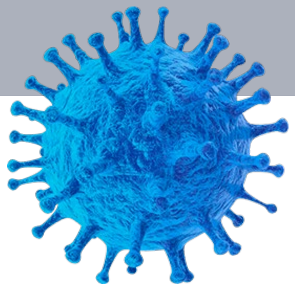
Prototipos
R4 purificado
R1 purificado
R1 no purificado
R1 purificado (+polímero)
Control negativo





VLP-BVD
AQUILON

AQ06-05

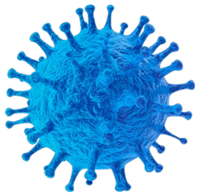


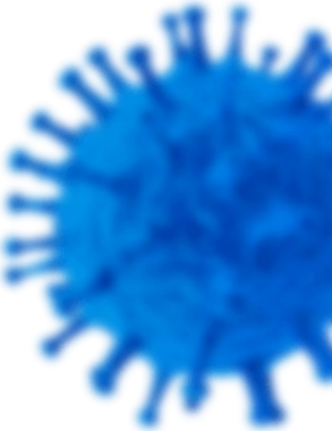
- Objetivo de la prueba

1. Evaluación de la respuesta inmune de los animales frente a una formulación más concentrada y a diferentes dosis del prototipo VLP-BVD **R4**
2. Confirmación del impacto en la respuesta inmune de una nueva formulación adyuvante basada en BLP (Bacterium-Like-Particles) a la concentración antigénica máxima

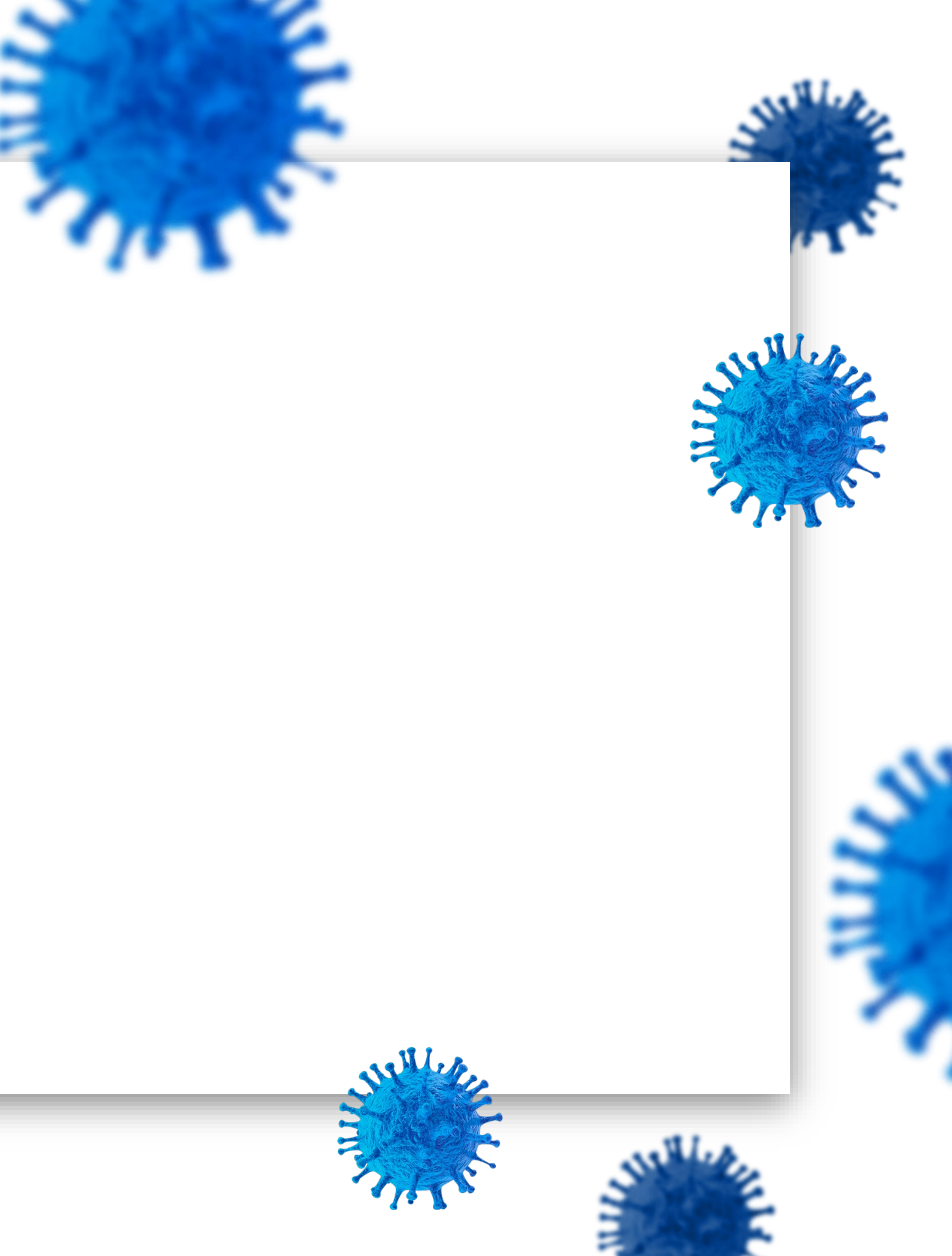
X6

Prototipos
R4
R4 ½ dosis
R4 ¼ dosis
Control negativo

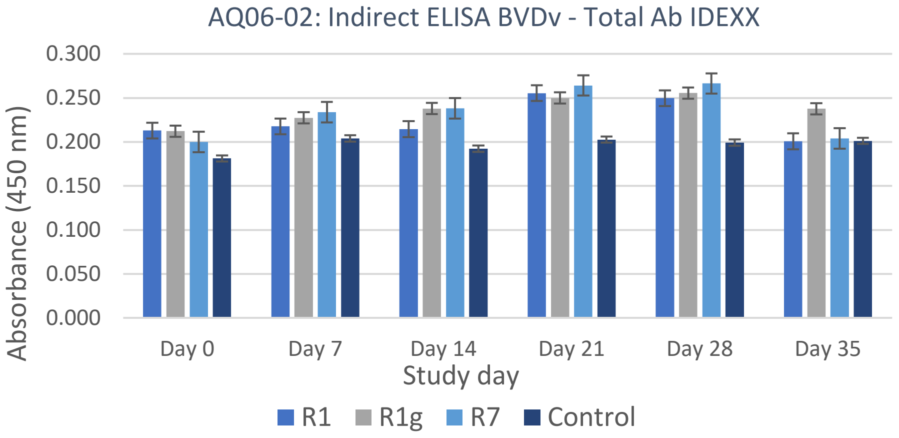


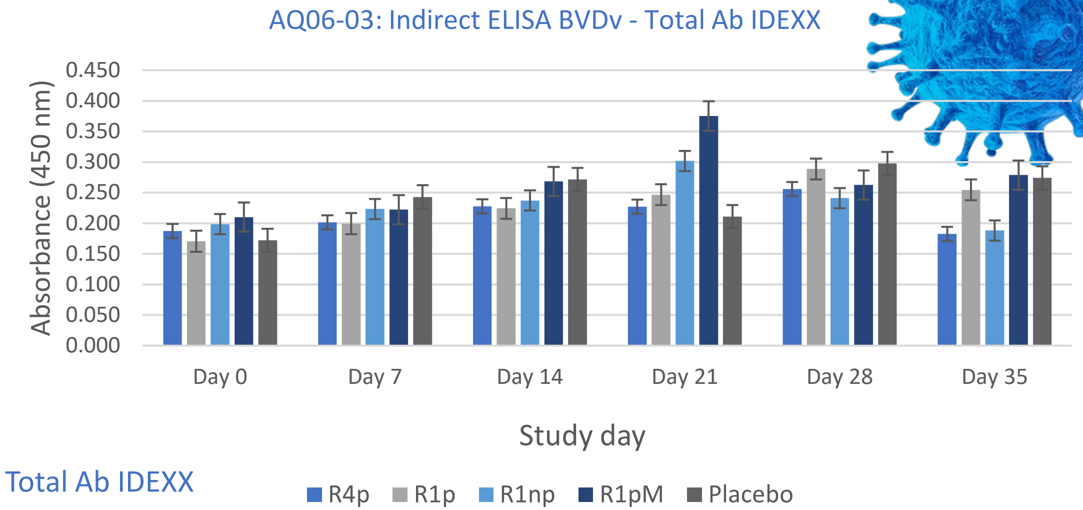


BVDv Total Ab

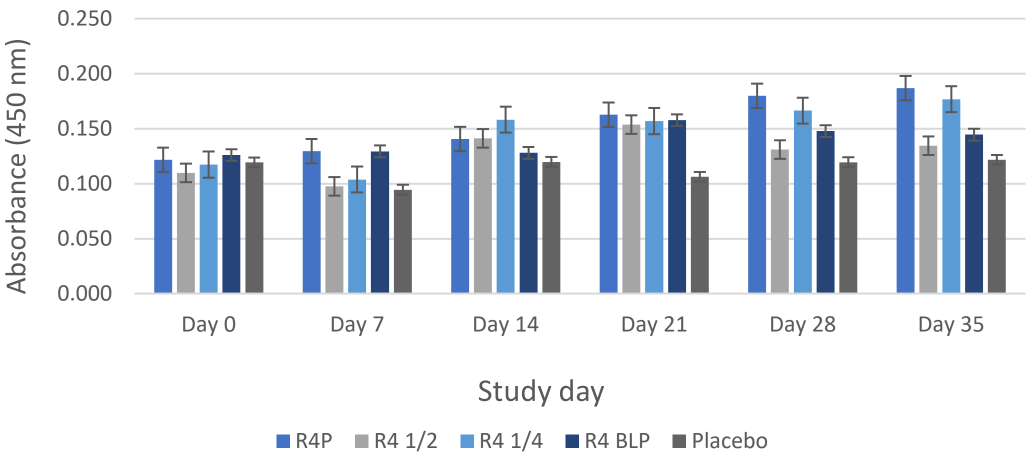


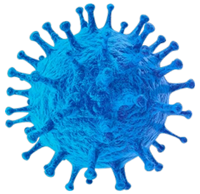
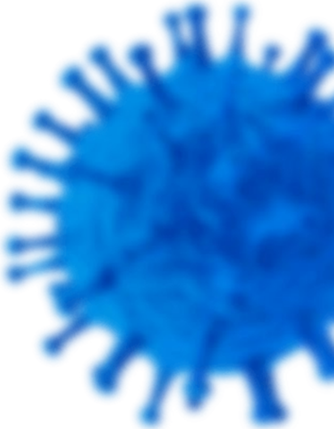
AQ06-02: BVDv Total Ab


AQ06-02: Indirect ELISA BVDv - Total Ab IDEXX

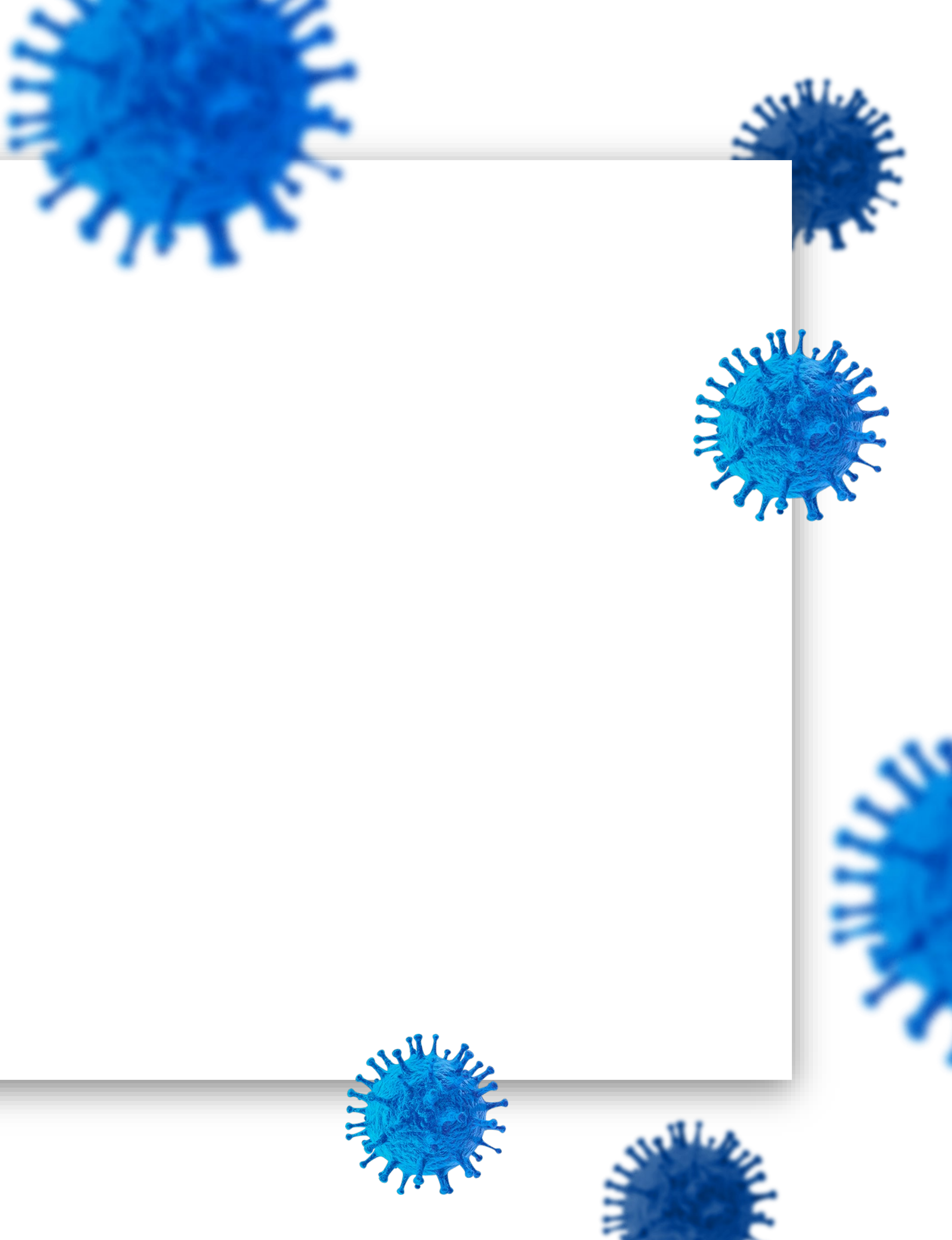

AQ06-03: Indirect ELISA BVDv - Total Ab IDEXX

AQ06-05: Indirect ELISA BVDv - Total Ab IDEXX



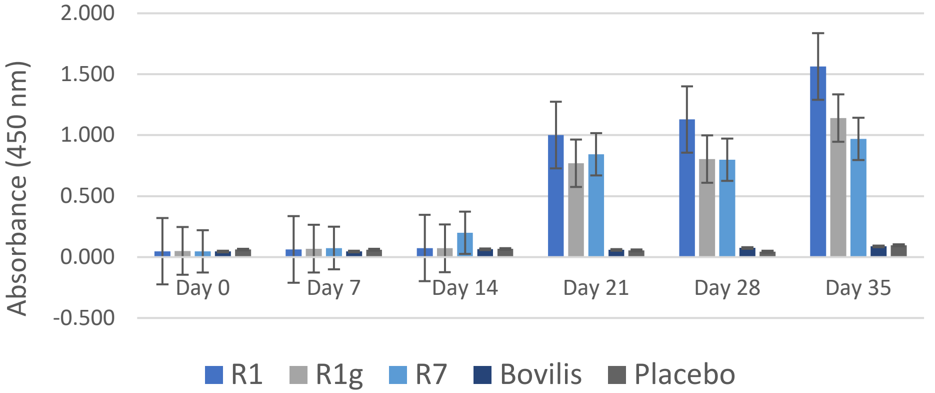



IBD-VP2

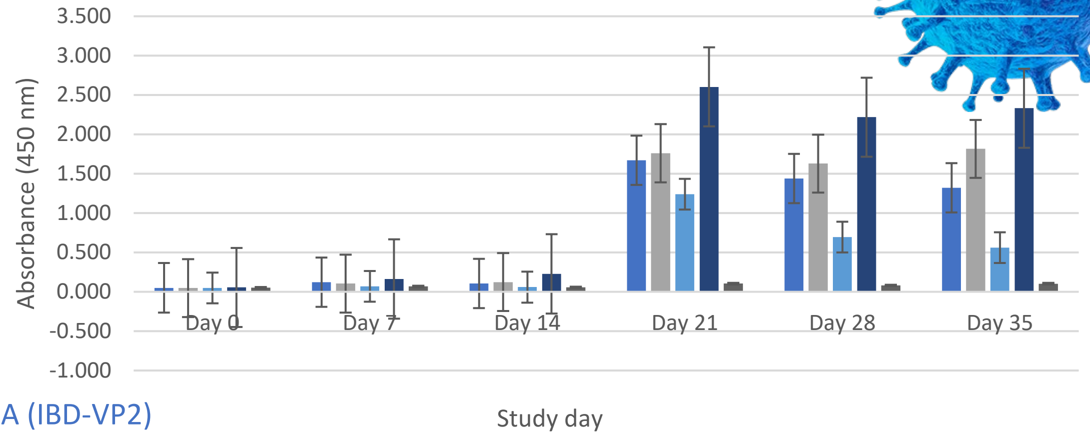


AQ06-02: IBD-VP2

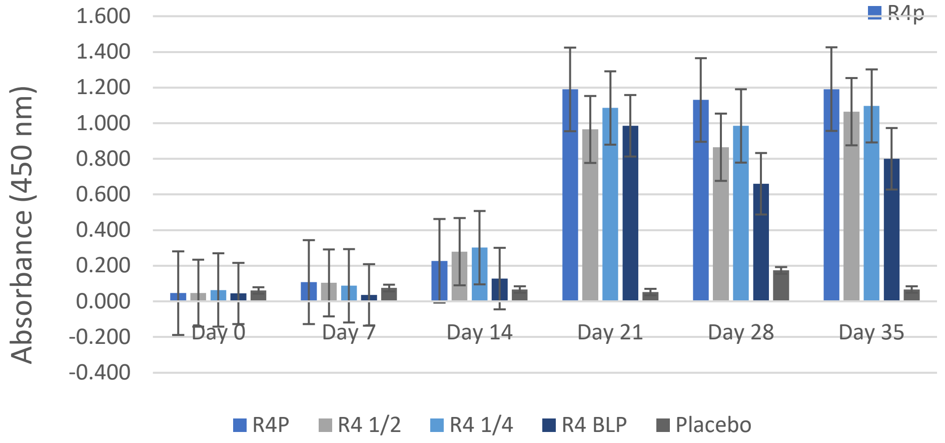
AQ06-02 Indirect ELISA (IBD-VP2)



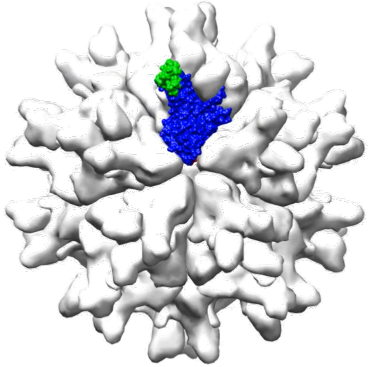
AQ06-03 Indirect ELISA (IBD-VP2)



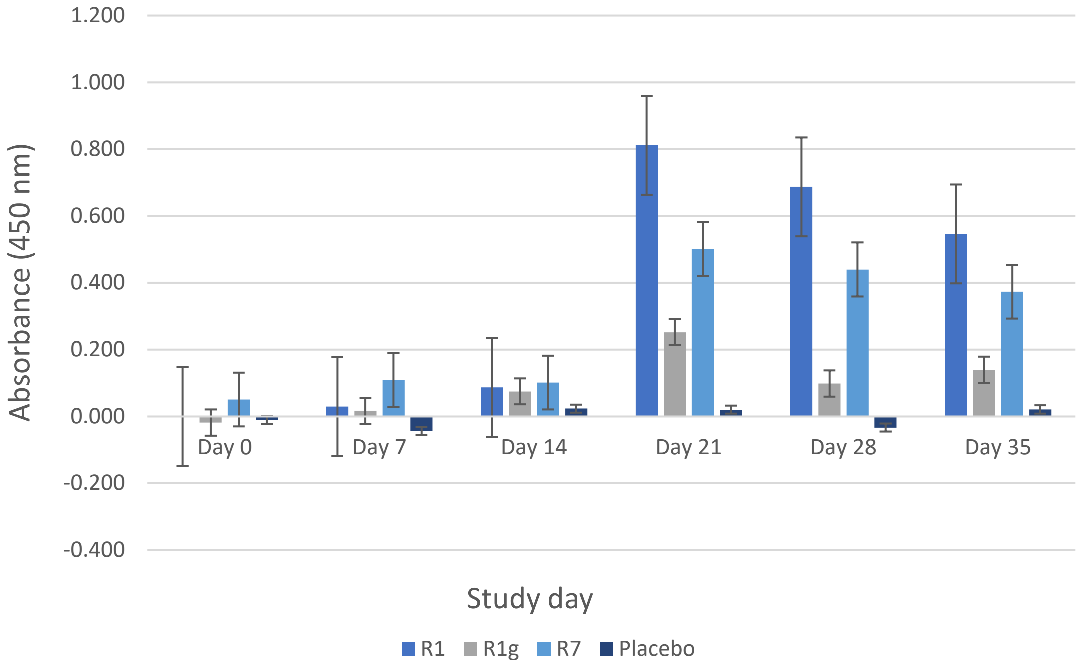
AQ06-05 Indirect ELISA (IBD-VP2)



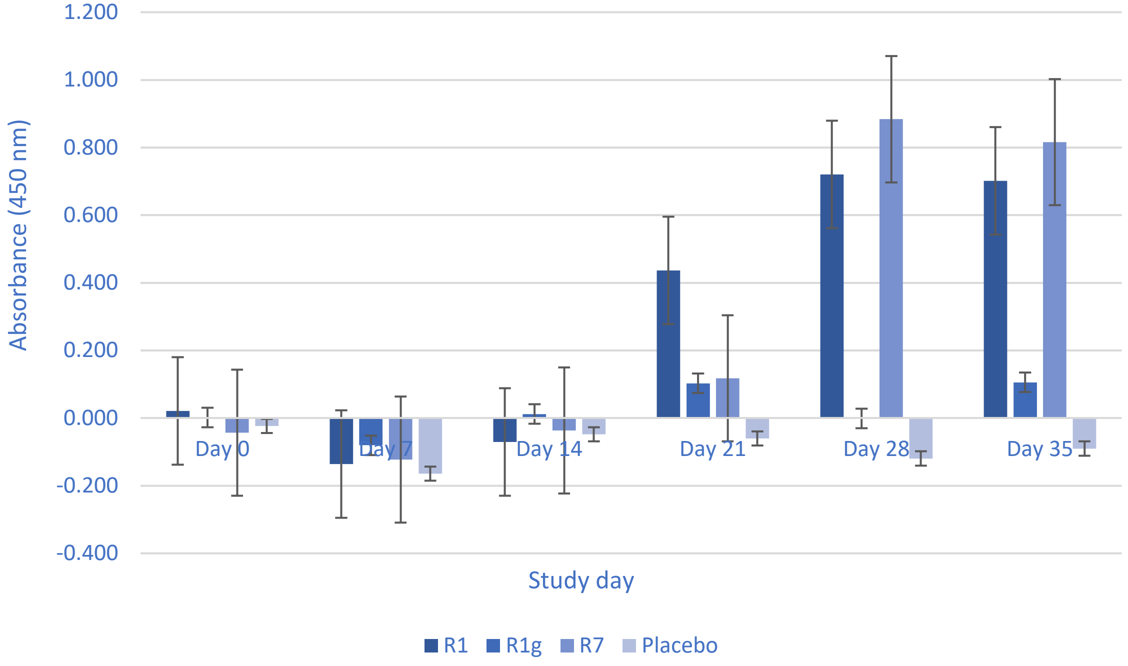
Péptidos P99 y P35



AQ06-02

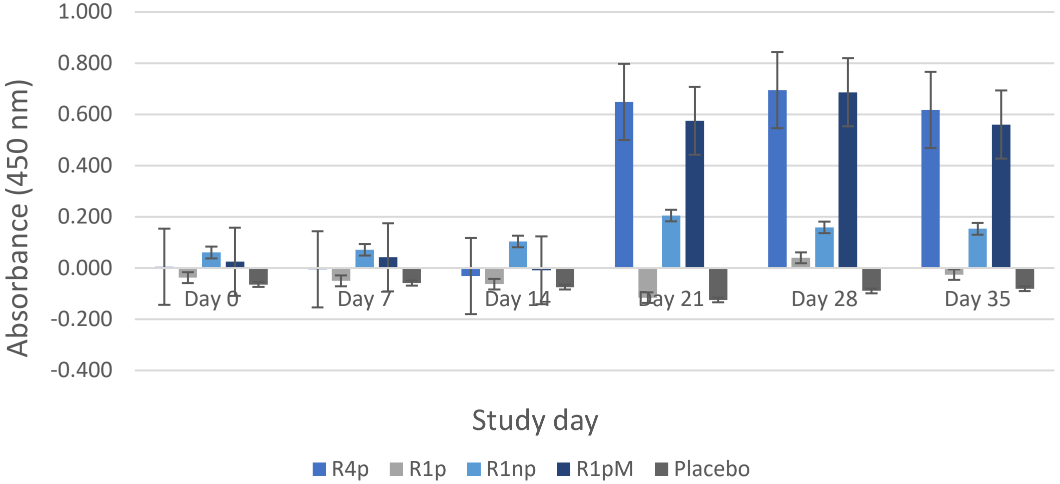


AQ06-02 Peptide **P99** (*In-house* ELISA)

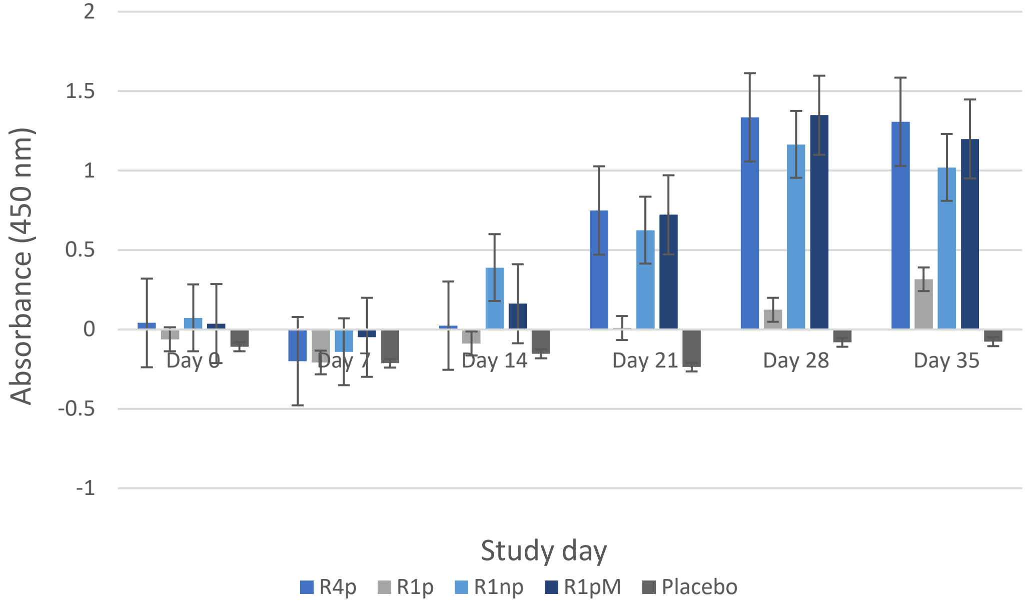


AQ06-02 Peptide **P35** (In-house ELISA)

AQ06-03

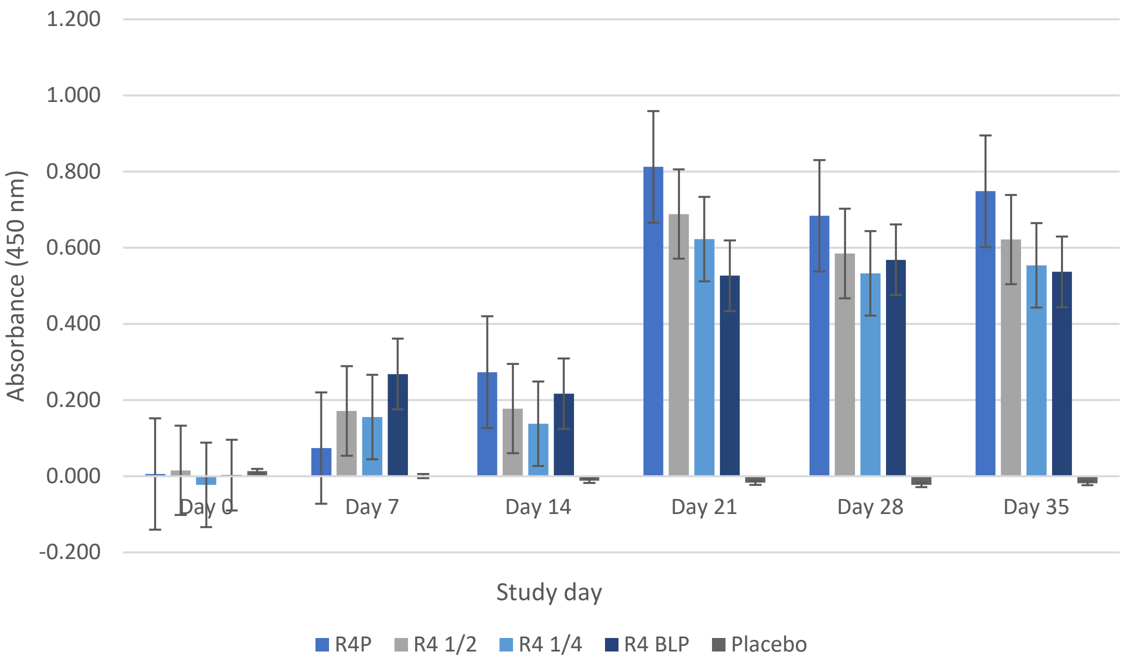


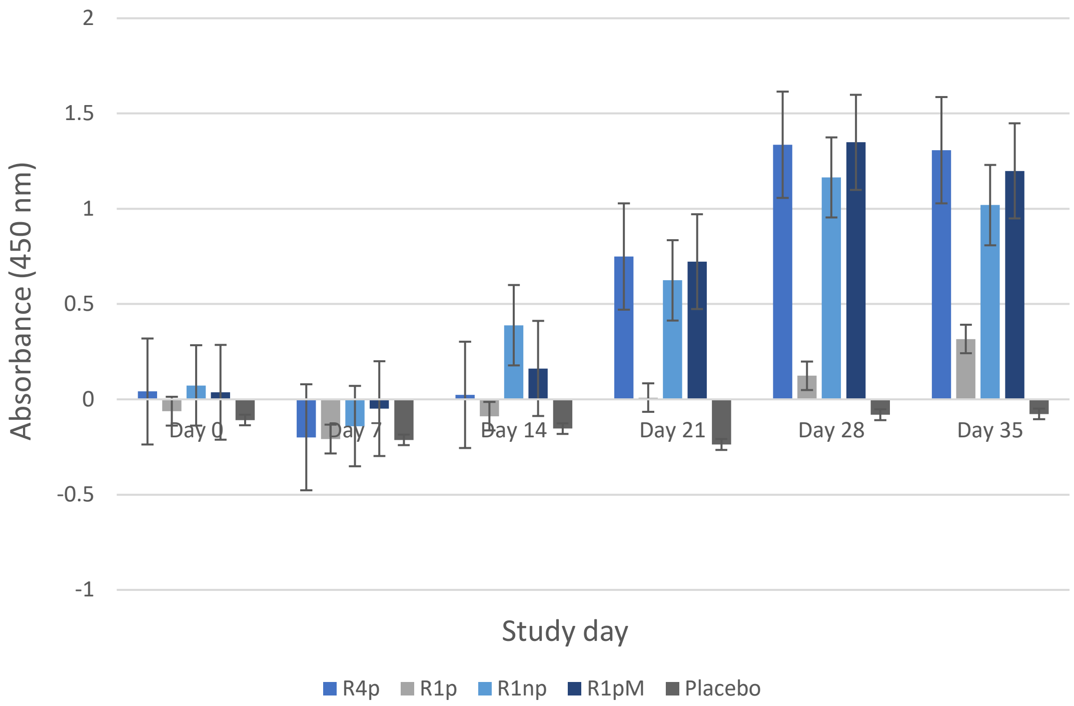
AQ06-03 Peptide P99 (*In-house* ELISA)



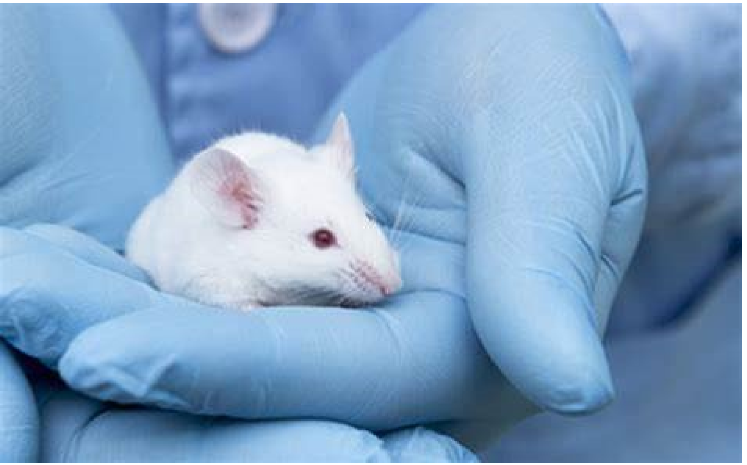
AQ06-03 Peptide P35 (*In-house* ELISA)

AQ06-05


AQ06-05 Peptide P99 (In-house ELISA)

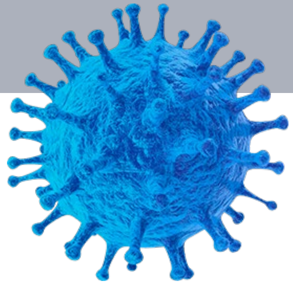

AQ06-03 Peptide P35 (*In-house* ELISA)

Análisis *ex vivo*



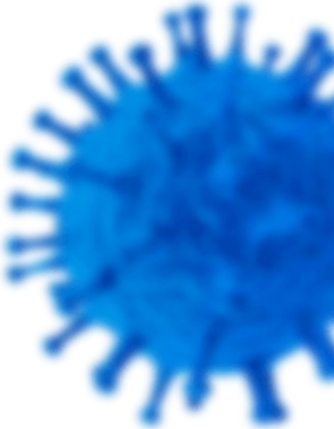
VLP-BVD
AQUILON

AQ06-04



- Ensayo de citotoxicidad en explantes
- Valoración de la producción de citoquinas *in vitro* ante la presencia de antígenos vacunales

Sustancia activa	Adjuvantes
R1 (P99)	A: Alhidrogel
R4 (2 copias del P99)	B: Montanide gel
R7 (P99+P35)	C: Saponine
(Purificados y no purificados)	C y D: BLPs

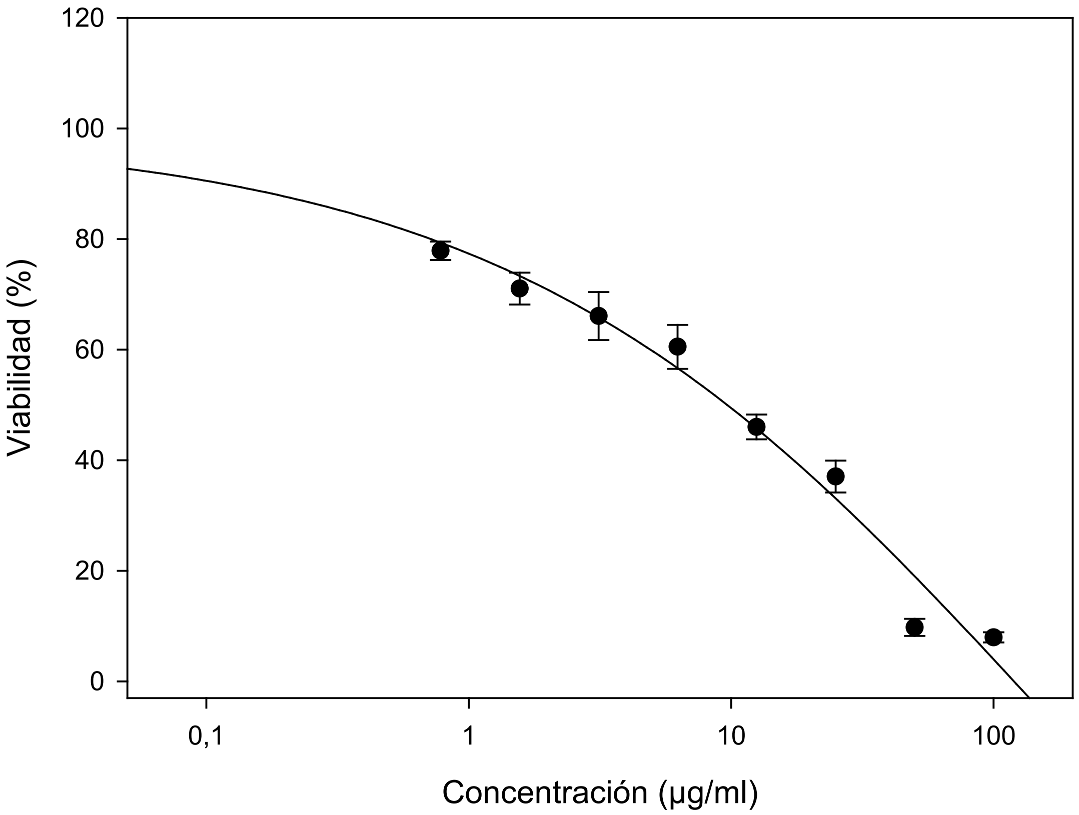


Inbiotec
INSTITUTO
DE BIOTECNOLOGÍA
DE LEÓN

universidad
de león

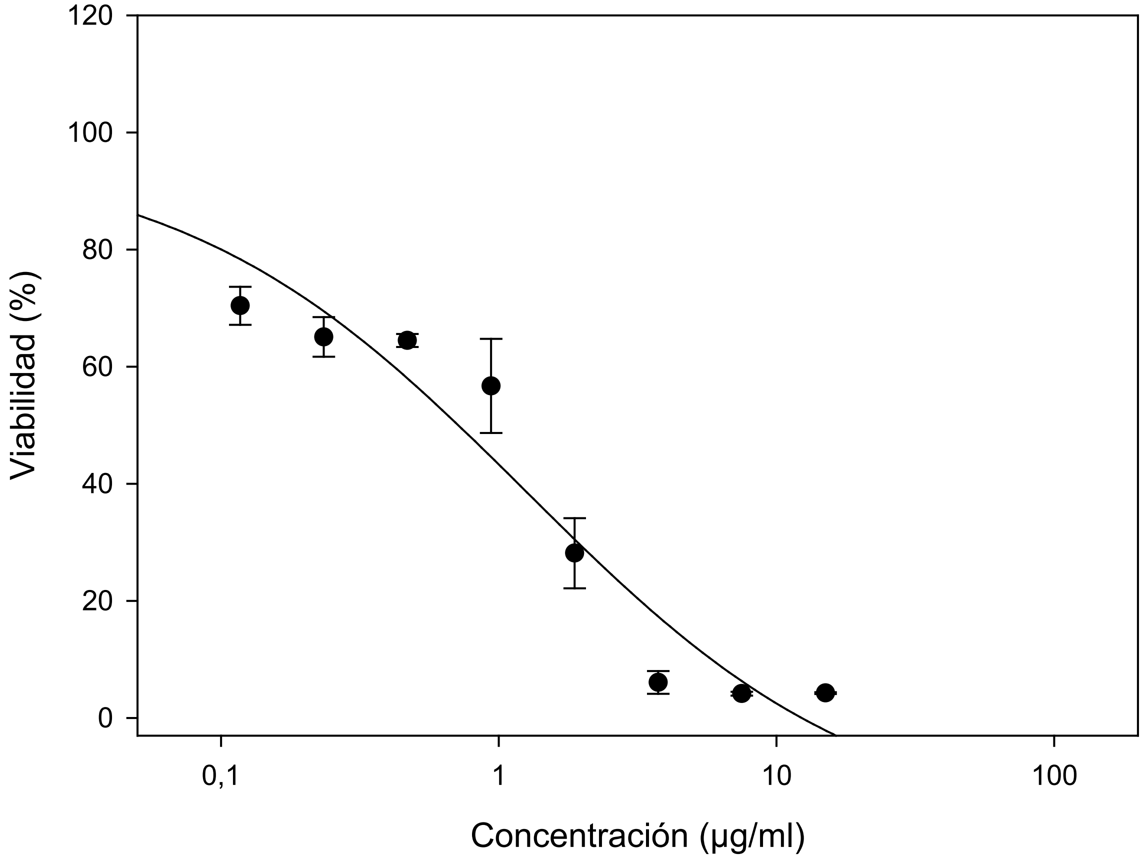
AQ06-04: Ensayo de citotoxicidad

R1pA



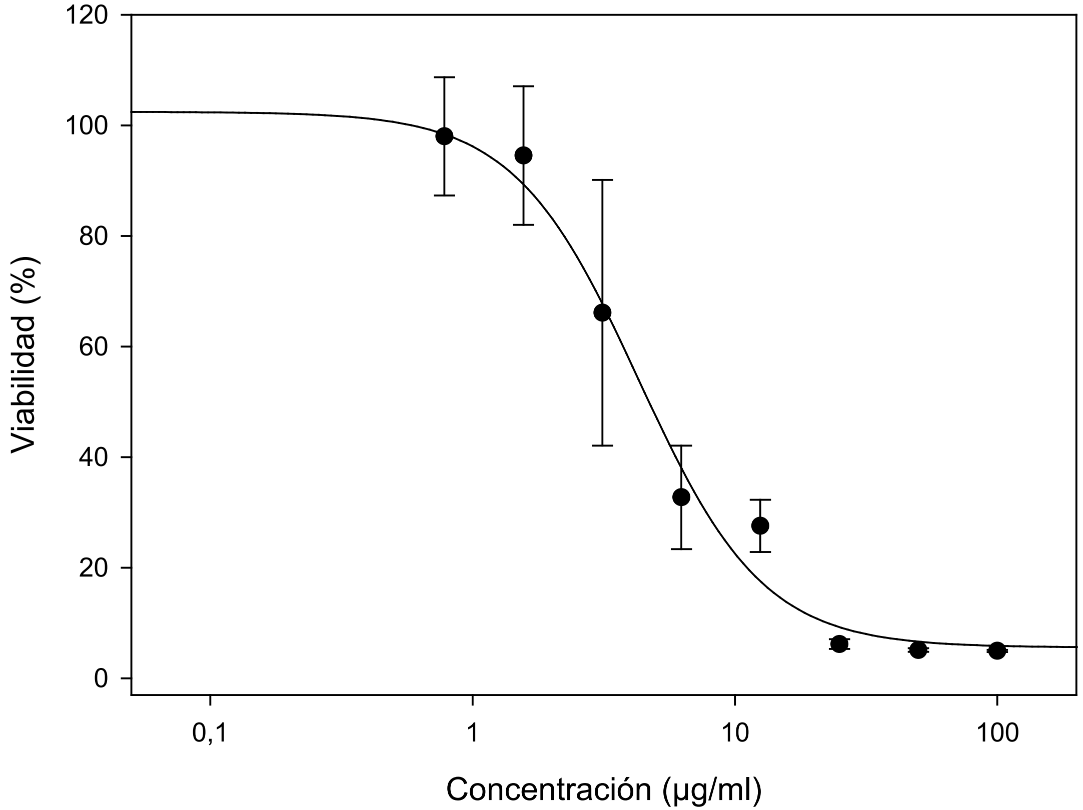
AQ06-04: Ensayo de citotoxicidad

R1npA



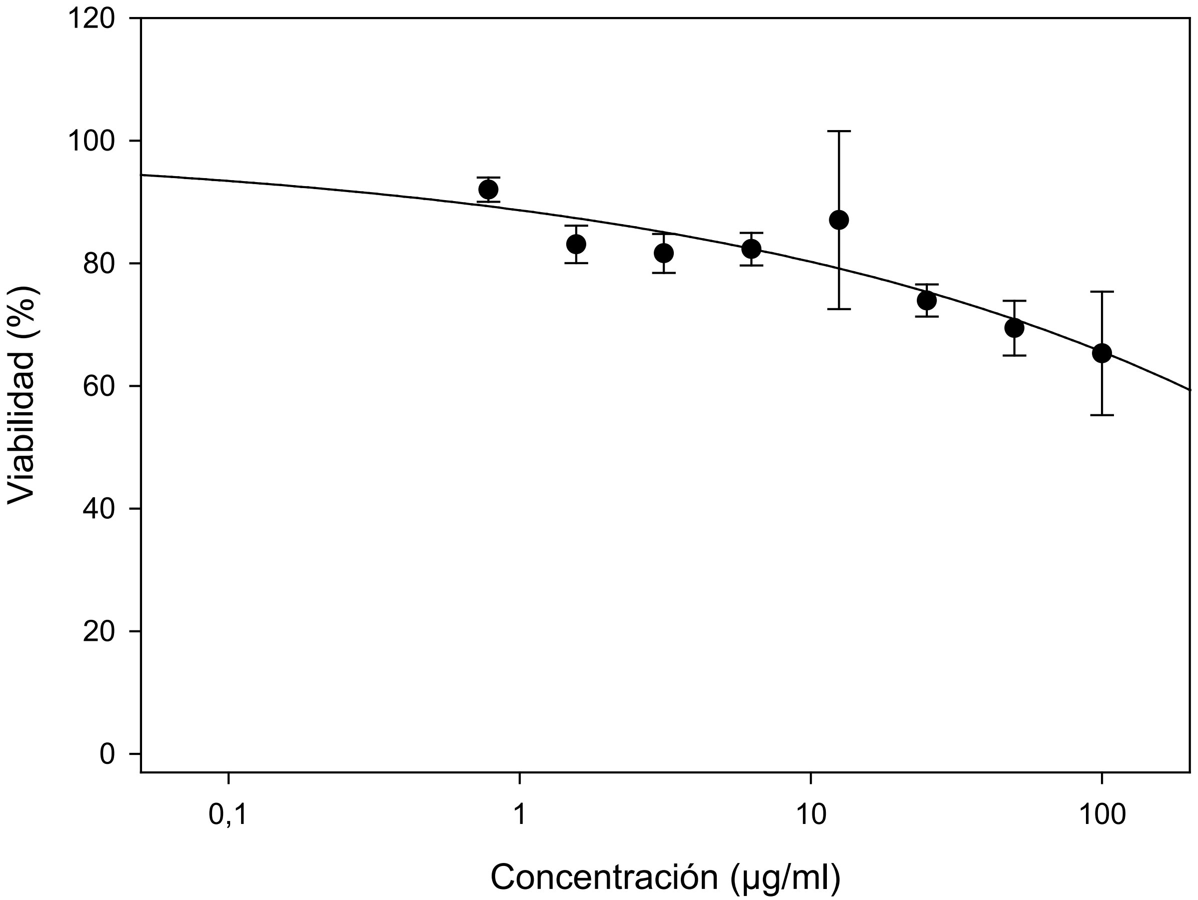
AQ06-04: Ensayo de citotoxicidad

R1pB

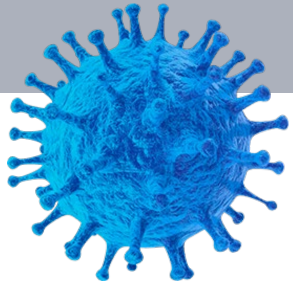


AQ06-04: Ensayo de citotoxicidad

R7pD



AQ06-04 1. Liberación citoquinas



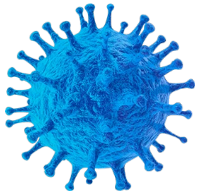
- Diseño de la prueba

Balb/c
(Tipo de inmunidad Th2)

C57BL/6
(Inmunidad tipo Th1)

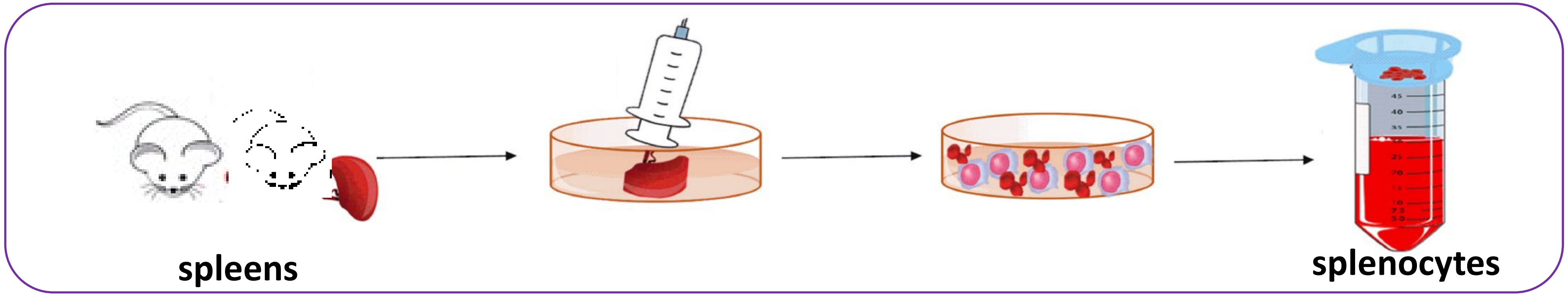
- CITOQUINAS

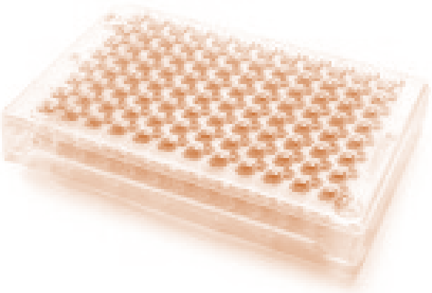
	Adjuvant				
Antigen	**A**	**B**	**C**	**D1**	**D2**
R1p	R1pA	R1pB	R1pC		
R1np	R1npA	R1npB	R1npC		
R4p	R4pA	R4pB	R4pC		R4pD2
R4np	R4npA	R4npB	R4npC		R4npD2
R7p	R7pA	R7pB	R7pC	R7pD1	
R7np	R7npA	R7npB	R7npC	R7npD1	



Balb/c
(Th2 type immunity)

C57BL/6
(Th1 type immunity)





96-well plates

Balb/c splenocytes

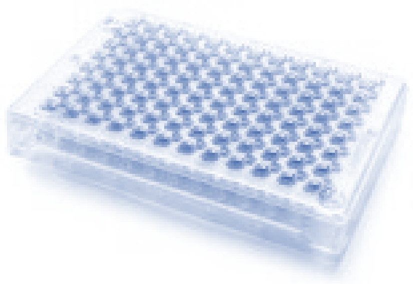
Control -: RPMI medium.

Control +: RPMI medium with LPS (10 µg/ml).

Samples: RPMI medium with:
-Adjuvants (2,5%)
-Vaccine prototype* (adjuvant concentration fixed at 20%)

	Adjuvant				
Antigen	**A**	**B**	**C**	**D1**	**D2**
R1p	R1pA	R1pB	R1pC		
R1np	R1npA	R1npB	R1npC		
R4p	R4pA	R4pB	R4pC		R4pD2
R4np	R4npA	R4npB	R4npC		R4npD2
R7p	R7pA	R7pB	R7pC	R7pD1	
R7np	R7npA	R7npB	R7npC	R7npD1	

*concentrations based on cytotoxicity assays



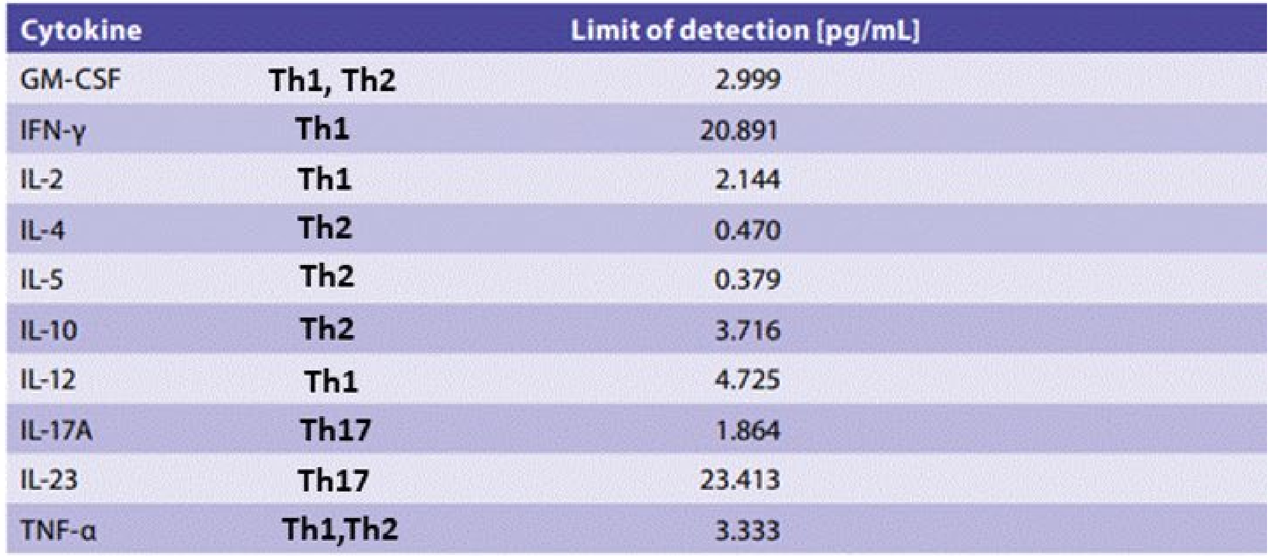
96-well plates

C57BL/6 splenocytes

Citoquinas Evaluadas

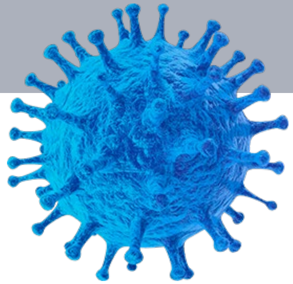
MACSQuant Analyzer 10 Flow Cytometer (Miltenyi Biotec)

Cytokines detected with the MACSPlex Cytokine 10 Kit (Miltenyi Biotec)



Cytokine		Limit of detection [pg/mL]
GM-CSF	**Th1, Th2**	2.999
IFN-γ	**Th1**	20.891
IL-2	**Th1**	2.144
IL-4	**Th2**	0.470
IL-5	**Th2**	0.379
IL-10	**Th2**	3.716
IL-12	**Th1**	4.725
IL-17A	**Th17**	1.864
IL-23	**Th17**	23.413
TNF-α	**Th1,Th2**	3.333

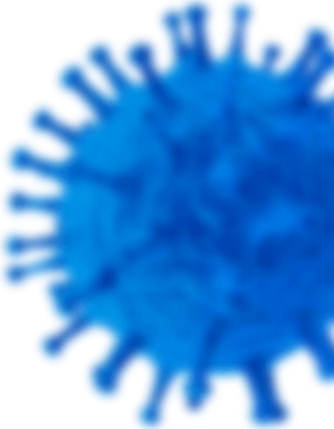
AQ06-04: Ensayo de citoquinnas

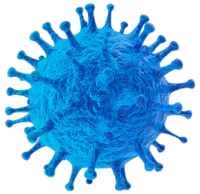


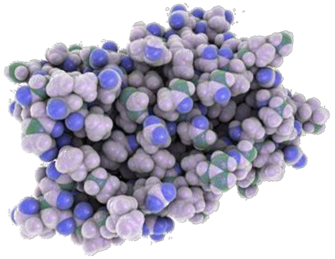
- Niveles similares o más bajos de todas las citoquinas

La tendencia general indica que se obtuvieron resultados similares tanto con el antígeno purificado como con el no purificado y, por lo tanto, la purificación del antígeno no es relevante para el análisis inmunológico *ex vivo*.

Tampoco variaron significativamente en los esplenocitos de ratones de inmunidad Th2 mientras que en los esplenocitos de ratones de inmunidad Th1 se observó una reducción en las IL-2, IL-4, IL-5, IL-12 y en el TNF-α y un aumento de la IL-10 (antiinflamatoria)

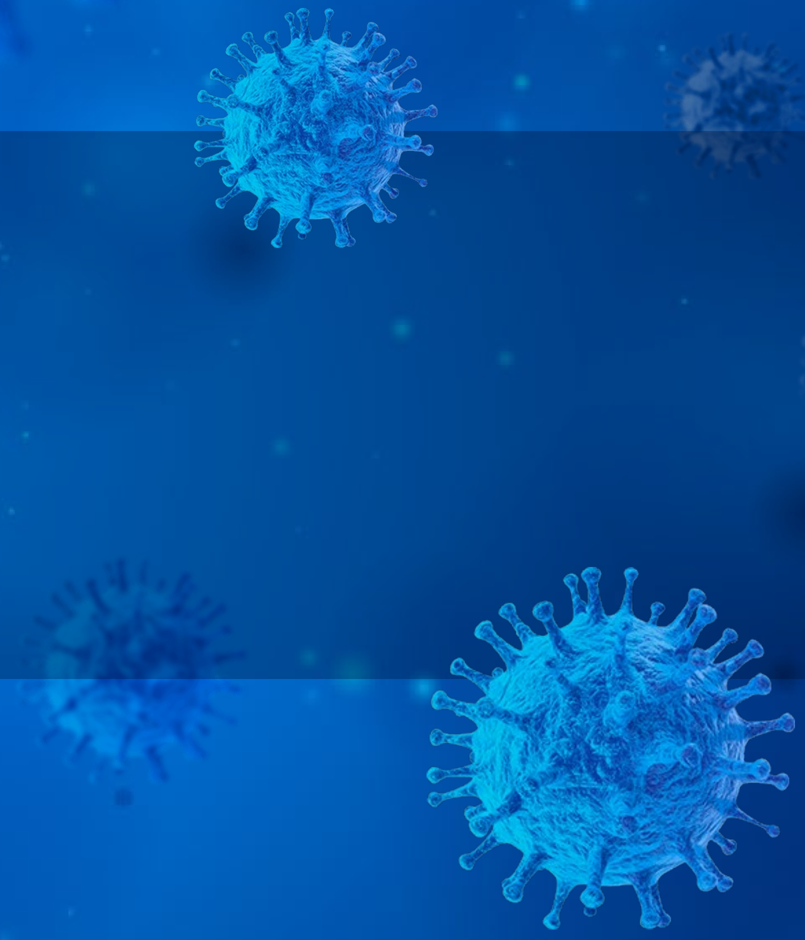






VLP-BVD
AQUILON

¡¡GRACIAS POR VUESTRA ATENCIÓN!!



VLP-BVD
AQUILON

¿PREGUNTAS?