

Factores adyuvantes en las vacunas de ADN

La inmunización con ácidos nucleicos es un procedimiento de vacunación consistente en la inyección de un plásmido de ADN bacteriano en el que se insertó una secuencia que codifica para un antígeno específico¹ convirtiendo, de esa manera, al vacunado en un "biorreactor" que produce el antígeno vacunante directamente en sus células. Además de la capacidad de inducir una respuesta humoral y celular específicas, la vacuna de ADN, debido a la presencia de secuencias de nucleótidos que se caracterizan por tener CpG, (citocina, fosfato guanina) no metiladas, tienen la capacidad de modular la respuesta inmune estimulando la producción de interleuquinas del tipo Th-1. El rol adyuvante de esas secuencias CpG en las vacunas de ADN es hoy universalmente aceptado². Las células presentadoras de antígenos (CPA) se comportan como el nodo de la red de comunicaciones que une la inmunidad innata a la adquirida, y gracias al control que tienen sobre la expresión de las citoquinas y las moléculas coestimuladoras, determinan la magnitud y la calidad (Th1 - Th2) de la respuesta inmune.

Basado en evidencias empíricas Freund usó extractos de Micobacteria, por su poder activador y modulador de la respuesta inmune, como parte de su fórmula del adyuvante que aun hoy es universalmente usado en experimentación. Estudios recientes demuestran que el ADN bacteriano tiene secuencias inmunoestimuladoras (ISS) (*Immuno Stimulatory Sequences*) que incluyen las CpG no metiladas, éstas estimulan componentes esenciales de la inmunidad innata. En respuesta a esa estimulación, los macrófagos, los monocitos y las células dendríticas, secretan las citoquinas proinflamatorias IL-6 e IL-12 y aumentan la expresión de moléculas coestimulantes CD80, CD86 y CD40³. Estos hallazgos sugieren que el sistema inmune innato de mamíferos ha evolucionado de manera tal que reconoce y reacciona contra secuencias características del ADN bacteriano por medio de receptores que reconocen estructuras o perfiles moleculares (PRR) (*pattern recognition receptors*). Esos receptores detectarían el ADN del patógeno invasor emitiendo una "señal de alarma"³ para el sistema inmune. Para que la respuesta a una infección sea efectiva y duradera, el sistema inmunológico adaptativo requiere señales que le den indicaciones precisas sobre la procedencia del antígeno y del tipo de respuesta a producir. Esta información le es suministrada por el sistema de inmunidad innata. Los macrófagos, deben reconocer las estructuras moleculares asociadas al agente invasor (PAMPs) (*Pathogen Associated Molecular Patterns*) que diferencian al patógeno del huésped y que además le permiten discriminar entre diferentes patógenos.

La capacidad de estimular y su efecto biológico depende de la secuencia de ADN específica y de la especie de mamífero estudiada. Así es que mientras algunas secuencias estimulan preferentemente células murinas otras lo hacen sobre células humanas, sin embargo las secuencias de ADN que activan las células inmunes del humano y del ratón se diferencian tan solo en un nucleótido siendo la secuencia óptima para el ratón GACGTT y para el humano GTCGTT².

El ADN bacteriano se comporta como un adyuvante en eucariotes. La exposición de vertebrados al ADN bacteriano activa la respuesta inmune innata estimulando las CPA y las NK que se encargan de promover preferentemente la inducción de una respuesta Th1 y células citotóxicas (CTL)⁴, de vital importancia en la protección contra patógenos intracelulares. Las células B, las NK, las dendríticas

(CD) y los macrófagos son activadas directamente por el ADN bacteriano. La respuesta de las CD y los macrófagos a la estimulación con ISS *in vivo* es muy importante por cuanto se las considera las células iniciadoras de la respuesta inmune⁵.

Los macrófagos son activados directamente por las CpG-ODN (CpG Oligo Deoxi Nucleótido) se vuelven citotóxicas y producen TNF- α , IL-12, IL-18 e IFN- α/β . Estas citoquinas estimulan, a su vez, la producción de IFN- γ por las células NK en la fase innata y por las células Th1 en la fase adaptativa de la respuesta a las CpG-ODN-antígeno. Este IFN- γ a su vez estimula las CPA cerrando, de esta manera, un círculo virtuoso⁶.

Las CD, consideradas las células centinelas que hacen puente entre la inmunidad innata y la adaptativa son activadas por las CpG-ODN. En respuesta a esa estimulación producen IL-6, IL-12 y TNF- α . La IL-12 se encargaría de activar las células T colaboradoras (Th-1) El tratamiento de CD, *in vitro*, con CpG-ODN resulta en la estimulación de las moléculas coestimuladoras ICAM-1 (CD54), y CD40 y en el aumento del nivel de MHC clase II y CD86⁷.

Las CpG-ODN pueden activar directamente las células B como parte de la respuesta innata (independientemente de la presencia de un antígeno) y también pueden actuar como señal coestimuladora. Las células B estimuladas, *in vitro*, con CpG-ODN, proliferarán y comenzarán a producir IgM policlonal sin la ayuda de células T colaboradoras. También producirán altos niveles de IL-6 e IL-12.

Las CpG-ODN inducen la actividad lítica y la secreción de IFN- γ por parte de las células NK. Sin embargo las células purificadas en el laboratorio requieren de la presencia de IL-12, TNF- α e IFN- α/β producidos por las CPA. Aunque las NK producirán IFN- γ serán las células CD4+, las que contribuirán, más tarde, con la mayor parte de estas citoquinas.

Las células T no son activadas directamente por ADN bacteriano ni por las CpG-ODN tampoco participan de una respuesta innata a CpG-ODN⁷, sin embargo tanto las CD4+ como las CD8+ son de vital importancia para una respuesta Th1 a una vacunación génica.

La respuesta a la vacunación génica o a la inyección conjunta de CpG-ODN/antígeno, se manifiesta en la generación de células citotóxicas (CTL) y Th1 con un predominio de IgG2a sobre IgG1 y un incremento de interferón gamma acompañado de una reducción de IL4, IL5 e IL10.

La generación de una fuerte respuesta Th1 puede evitar y aun suprimir, en caso de que estuviera instalada, una respuesta Th2 contra el mismo antígeno. Recientes publicaciones sobre experimentos en monos y humanos con una vacuna génica de primera generación indican que se generó una pobre respuesta inmune⁸. Aparentemente esa respuesta pobre se debería a la baja cantidad de antígeno expresado, o a la sensibilidad de las uniones fosforodiéster (P)ODN a las nucleasas lo que hace que tengan una vida corta (de alrededor de unos 20 minutos) por cuya razón tendrían que ser inyectadas repetidamente para alcanzar una concentración intracelular adecuada y con ello un efecto adyuvante.

Por una modificación química, se puede convertir la unión fosforodiéster en un fosforotioato, ((S)ODN), logrando que el oligodeoxinucleótido se vuelva resistente a la degradación enzimática.

Es muy poco lo que se conoce sobre los mecanismos de acción de las CpG. Para Hemmi el receptor de los CpG-ODN⁹ es un receptor muy parecido al Toll de la *Drosófila* (Toll Like Receptor) (TLR9) que sería el encargado de reconocer las secuencias CpG-ODN.

El nombre Toll es circunstancial y no tiene nada que ver con las características biológicas ni funcionales de la molécula. Estudiando el desarrollo embrionario de la mosca de la fruta Nüsslein-Volhard y Wieschaus descubrieron un mutante letal que afectaba el perfil embrionario de la *Drosophila melanogaster*. Ninguno de los huevos puestos por una hembra heterocigota fue fértil. Cuando Wieschaus le mostró el perfil de la cutícula de los embriones estériles a Nüsslein-Volhard, ésta exclamó "Toll", que en lunfardo alemán significa algo así como "imposible", "que locura". Está claro que la participación de Toll en la respuesta inmune no pudo ser deducida de su acción sobre el desarrollo embriológico de la

mosquita. En cambio se pudo establecer su función en estudios sobre la activación de genes inducidos por la infección¹⁰ donde las proteínas Toll muestran una marcada especificidad por el perfil molecular del ligando, reconociendo específicamente hongos, bacterias Gram positivas y Gram negativas. Diferentes proteínas de la familia Toll de *Drosophila* activan distintos circuitos intracelulares e inducen la producción de proteínas antimicrobianas específicas que matan a los patógenos.

Todos los miembros de la familia Toll de mamíferos son proteínas de membrana que la atraviesan una sola vez y que poseen un dominio extracelular muy parecido entre ellas y rico en leucina LRR (*leucine-rich repeats*) y un dominio citoplasmático de unos 200 amino ácidos que es muy parecido al receptor de la IL-1, Toll/ IL-1 receptor, (TIR).

La decisión del sistema inmune de responder con una reacción tipo Th1 o Th2 dependerá de varios factores entre los que cabe destacar las citoquinas del medio donde el antígeno se va a encontrar por primera vez con las células inmunes específicas. Si ese encuentro se realiza en un medio con citoquinas del tipo Th1 seguramente se producirá una reacción del tipo Th1. Estudios epidemiológicos sugieren que infecciones con *Mycobacteria* a edad temprana que induce una respuesta tipo Th1, protegerían contra el desarrollo subsecuente de atopías incluyendo asma¹¹. La inmunoterapia actual, si bien efectiva en algunos casos, tiene el inconveniente de ser un tratamiento a largo plazo con múltiples inyecciones que encierra, aunque en muy bajo porcentaje, el peligro de la anafilaxia¹². Por otra parte los intentos de modificar químicamente los alérgenos resultaron en la reducción y modificación de su antigenicidad. En algunos modelos experimentales de enfermedades atópicas la inyección de IL-12 pudo reducir la producción de IL-4 y aumentar el IFN- γ en los fluidos de las vías respiratorias resultando en una reducción de la eosinofilia¹³. Sin embargo ensayos clínicos con el uso de IL-12 resultaron en una marcada morbilidad y aun en casos de mortalidad. Más aún, en modelos experimentales se ha visto que la inyección de IL-12 agrava la inflamación eosinofílica.

Por otro lado se ha demostrado que la vacunación génica con un plásmido que codifica el antígeno β galactosidasa (β -gal) induce una fuerte respuesta Th1. Esta respuesta será dominante sobre una anterior o posterior del tipo Th2 producida por la inyección de β -gal/alum. En particular la síntesis de IgE será completamente inhibida si el plásmido se da antes que la β -gal/alum. Además Hsu y col.¹⁴ comunicaron que la inyección del plásmido codificando el alérgeno Der p 5 del gorgojo del polvo de habitación (dermatófago) inhibe la inducción de alergia por posteriores inyecciones del alérgeno. Esta protección pudo ser transmitida a ratones vírgenes por el trasplante de células T CD8⁺¹⁴.

Secuencias inmunoestimuladoras conjugadas con alérgenos han podido convertir la reacción Th2 del alérgeno Amb a1 de *ragweed* (ambrosia) en una reacción favorable tipo Th1¹⁵. Esta respuesta duró por lo menos 6 semanas. La inyección conjunta del alérgeno y la secuencia CpG-ODN sin conjugar es mucho menos efectiva en la inducción de la respuesta Th1.

De lo expuesto surge que el empleo de las vacunas de ADN y los conjugados de alérgeno-CpG-ODN en el terreno experimental resulta promisorio y ya hay ensayos clínicos en marcha. Estas vacunas podrían ofrecer tratamientos de las alergias más seguros y más efectivos que las terapias actuales.

Entonces estas secuencias CpG han mostrado ser potentes adyuvantes; si a esto sumamos su bajo costo de producción, su estabilidad y la posibilidad de usarlo con diferentes tipos de vacunas podemos estar seguros de estar frente a un gran adelanto en la vacunología.

Moisés Spitz^{*1}, *Carlos A Velikovsky*², *Juliana Cassataro*^{1,2} *Guillermo H. Giambartolomei*^{1,2}

¹ Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina;

² Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU) Facultad de Farmacia y Bioquímica,

Universidad de Buenos Aires.

Fax: (54-11) 5950-8758

e-mail: labingen@fmed.uba.ar

1. Krieg AM., Yi A-K, Schorr J. and Davis JL. The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines. *Trends Microbiol* 1998; 6: 23-7.
2. Krieg AM. The role of CpG motifs in innate immunity *Curr Opin Immunol* 2000; 12: 35-43.
3. Wagner H Bacterial. CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger. *Adv Immunol.* 1999; 73: 329-68.
4. Wang R, Doolan DL, Le PT et al. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 1998; 282: 476-80.
5. Bauer M, Heeg K, Wagner HR, and Lipford GB. DNA activates human immune cells through a CpG sequence-dependent manner. *Immunology* 1999; 97: 699-705.
6. Klinman MD, Verthelyi D, Takeshita F and Ishii KJ. Immune recognition of foreign DNA a cure for bioterrorism? *Immunity* 1999;11: 123-9.
7. Pisetsky DS. Immune activation by bacterial DNA a new genetic code. *Immunity* 1996; 5: 303.
8. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R and Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides *J Immunol.* 1999; 162: 6284-9.
9. Hemmi H, Takeuchi O, Kawal T, Kalsho T, Sato S, Matsumoto M, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-5.
10. Aderem A. and Ulevitch RJ. 2000 Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406: 782-7.
11. Shirakawa T, Ecomoto T, Shimazu S and Hopkin M. The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 1997; 275: 77-80.
12. Weber RW. Immunotherapy with allergens. *JAMA* 1997; 278: 1881-7.
13. Van Uden J. and Raz E. Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 902-10.
14. Hsu CH, Chua KY, Tao MH, Huang SK, and Hsieh KH. Inhibition of specific IgE response in vivo by allergen-gene transfer *Int Immunol* 1996; 8: 1405-11.
15. Van Uden J. and Raz E. Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease *J Allergy Clin Immunol* 1999; 104: 902-10.

At first there is darkness.

Then a door suddenly opens - a shaft of bright light enters.

It illuminates directly one shining piece of knowledge.

But, as the eyes take time to become adapted

so that the whole room can be seen with just the shaft of light,

so scientific data must gradually and painstakingly be accumulated

so that not only the central fact,

but its place in the total setting of knowledge in the field,

can emerge.

The first breakthrough brings an excitement beyond compare.

Its full exploitation means years of hard and often tedious work.

It is a judicious combination of the former and latter

that sets the seal on a person's scientific creativity.

Al principio todo es tinieblas. . .

De repente una puerta se entreabre

dejando pasar un rayo de luz cegadora

que ilumina sólo una parte del conocimiento.

Sin embargo, así como los ojos necesitan tiempo

para percibir la totalidad del ambiente

gracias a ese rayo de luz,

así los hallazgos científicos deben ser acumulados

gradual y penosamente

para que la claridad de la luz no muestre

sólo el hecho central

sino el conjunto desde el cual emerge.

La visión inicial aporta una exaltación incomparable,

pero su completa explotación significa años de duro

y muchas veces tedioso trabajo.

Es la equilibrada combinación entre el entusiasmo inicial

y la búsqueda metódica y prudente

lo que define la creatividad científica del hombre.

G.J.V. Nossal