

VSSP: un nuevo adyuvante para la vacunación de pacientes inmunocomprometidos

✉ Circe Mesa, Joel de León, Luis E Fernández

Departamento de Vacunas, Centro de Inmunología Molecular (CIM)
Ave. 216 esq. 15, Atabey, Playa, CP 16040, Ciudad de La Habana, Cuba
E-mail: circe@ict.cim.sld.cu

RESUMEN

En el Centro de Inmunología Molecular se diseñó y describió un nuevo adyuvante para usar en vacunas destinadas al tratamiento a pacientes inmunocomprometidos. Estos proteoliposomas de muy pequeño tamaño, llamados VSSP (del inglés, *very small size proteoliposomes*), combinan en su estructura el gangliósido GM3, para el que se han descrito propiedades supresoras del sistema inmune, y vesículas de membrana externa de *Neisseria meningitidis* con demostradas características inmunoestimuladoras. En este trabajo se demuestra que el VSSP, independientemente del predominio del gangliósido en su estructura, proveen al sistema inmune de las señales de "peligro" necesarias para la activación de las células dendríticas. Además, se evalúa cómo el VSSP en su interacción con estas células inducen la secreción de citocinas inflamatorias, como la IL-12, que a su vez provocan la polarización hacia Th1 de las células T cooperadoras. Se demuestra, también, que el VSSP estimulan la actividad funcional de las células T citotóxicas específicas, fenómeno que es facilitado por la presentación cruzada de antígenos exógenos y por la independencia de la cooperación de las células T cooperadoras para la expansión primaria de las células T citotóxicas. Estas propiedades fueron, además, avaladas por experimentos que demuestran la actividad antitumoral de dos vacunas celulares adyuvadas con el VSSP.

Introducción

Los adyuvantes son productos que incrementan o modulan la respuesta inmune específica a un antígeno (Ag) y, por tanto, son imprescindibles en las formulaciones de la mayoría de las vacunas. Por esta razón, por más de tres décadas se han invertido esfuerzos y recursos en la investigación científica para el desarrollo de nuevos y más potentes adyuvantes. Recientemente ha surgido un conjunto de teorías y conocimientos alrededor de la regulación del sistema inmune, los cuales han tenido una gran influencia en el desarrollo de los adyuvantes. Tal es el caso de las teorías de P. Matzinger y C. Janeway quienes plantean que el sistema inmune discrimina entre lo peligroso y lo inocuo, a través de receptores no clonales que reconocen patrones moleculares asociados a estas señales "peligrosas" [1, 2]. Basados en estas teorías se han descrito nuevos adyuvantes derivados de agentes patógenos con la peculiaridad de desencadenar la respuesta inmune mediante la activación de células dendríticas (DC, del inglés, *dendritic cells*) y el condicionamiento de estas para regular la respuesta de las células del sistema inmune adaptativo, fundamentalmente de los linfocitos T.

Una arista particular en el campo de la investigación de los adyuvantes, la constituye el desarrollo de vacunas terapéuticas para el tratamiento a pacientes inmunocomprometidos. Tal es el caso de las vacunas contra el cáncer o contra enfermedades virales crónicas como el SIDA. En estos casos, los tumores o virus, en su interacción con el hospedero, establecen mecanismos que suprimen el sistema inmune para así evadir su acción [3].

Los gangliósidos son glicoesfingolípidos que se sobreexpresan en la membrana de las células tumorales y son liberados por estas en cantidades considerables en forma de monómeros, micelas y vesículas de membrana. Los gangliósidos son potentes estimuladores del crecimiento tumoral *in vivo* y poseen capacidad inhibidora sobre múltiples eventos de la respuesta

inmune celular. Todos estos elementos sustentan la hipótesis de que los gangliósidos son uno de los factores solubles más importantes en la inmunosupresión provocada por los tumores [4]. Estos mecanismos de inmunosupresión son múltiples y no están completamente dilucidados. No obstante, está claro que tanto las células presentadoras de Ag (APC, del inglés, *antigen presenting cells*) como los linfocitos B y T se afectan de manera considerable por los gangliósidos derivados de tumores [5].

El Centro de Inmunología Molecular (CIM), en su esfuerzo por encontrar tratamientos efectivos contra el cáncer, ha diseñado un adyuvante o inmunopotenciador, con el objetivo no solo de potenciar la respuesta Ag específica, sino también de interferir en la inmunosupresión inducida por los tumores [6]. Para ello, se combinaron las propiedades inmunoestimuladoras de un sistema bacteriano, en este caso se utilizaron las vesículas de membrana externa (VME) de *Neisseria meningitidis*, con las propiedades inmunosupresoras del gangliósido GM3. Esta combinación dio lugar a proteoliposomas de muy pequeña talla (VSSP) en los que la proporción molecular gangliósido-proteína resultó ser 37:1. A partir de la superioridad molecular del gangliósido sobre las proteínas de la *Neisseria meningitidis*, se investigó, inicialmente, si en el VSSP predominaron las propiedades adyuvantes e inmunoestimuladoras.

Materiales y métodos

Preparación de células dendríticas murinas a partir de médula ósea

Las células dendríticas (DC) murinas se obtuvieron a partir de precursores aislados de la médula ósea de los huesos fémur y tibia de ratones recién sacrificados. Estas células se cultivaron a una densidad de 6×10^5 células/mL en D'MEM suplementado con 20 ng/mL

1. Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.

2. Janeway CA Jr, et al. Cross-linking and conformational change in T-cell receptors: role in activation and in repertoire selection. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54(2):657-66.

3. Pawelec G. Tumour escape: anti-tumour effectors too much of a good thing. *Cancer Immunol Immunother* 2004; 53(3):262-74.

4. Ladisch S, Kitada S, Hays EF. Gangliosides shed by tumor cells enhance tumor formation in mice. *J Clin Invest* 1987;79(6):1879-82.

5. McKallip R, Li R, Ladisch S. Tumor gangliosides inhibit the tumor-specific immune response. *J Immunol* 1999; 163(7):3718-26.

6. Estevez F, et al. Enhancement of the immune response to poorly immunogenic gangliosides after incorporation into very small size proteoliposomes (VSSP). *Vaccine* 1999;18(1-2):190-7.

✉ Autor de correspondencia

de GM-CSF (R&D, UK). Entre las 72 y las 90 horas de cultivo, se añadió medio de cultivo suplementado con GM-CSF. A los ocho días de cultivo se reemplazó el medio por un medio fresco; las DC se expusieron durante 18 horas a los diferentes estímulos y su fenotipo se analizó por FACS.

Ensayo de citotoxicidad *in vivo*

Esplenocitos totales de ratones singénicos vírgenes se marcaron con el fluoróforo CFSE (Molecular Probes, Paisley, UK) 1 mM y SIINFEKL 1 mM (CFSE++) o con CFSE 100 nM solamente (CFSE+) para obtener las células blanco. Para el ensayo de citotoxicidad, se inyectaron 60×10^6 células de la mezcla, por la vena de la cola, en los ratones previamente inmunizados con 1 mg de OVA sola o mezclada con 200 µg de VSSP. Dieciséis horas después, se determinó en el FACS el número de células CFSE+ y CFSE++ en el ganglio inguinal más cercano al sitio de inmunización. El porcentaje de lisis específica se determinó por la fórmula:

$$100 - \frac{\text{CFSE}^{++}}{\text{CFSE}^{+}} \cdot 100$$

Vacunación con células irradiadas y ensayo de reto tumoral

El modelo tumoral utilizado fue el carcinoma de colon CT26. En este ensayo se inmunizaron ratones Balb/c en el flanco izquierdo, por vía subcutánea, con PBS o con 10^6 células irradiadas (75 Gy) solas o en presencia de 200 µg de VSSP. A los 10 días de la vacunación, se inyectaron 10^5 células viables de CT26 en el flanco derecho también por vía subcutánea. Los animales se monitorearon durante los 60 días siguientes y se evaluó el prendimiento de los tumores.

Resultados y discusión

Activación de las células dendríticas

Las DC son las células presentadoras de Ag por excelencia y desempeñan una función protagónica en la iniciación de la respuesta inmune. Por esta razón, el efecto del VSSP en la expresión de MHC II y de algunas moléculas coestimuladoras se determinó en DC murinas derivadas de la médula ósea. Estos experimentos demostraron que las DC murinas tratadas con VSSP poseen una elevada expresión de las moléculas CD80, CD86, CD40 y MHC II. También demostraron que el efecto del VSSP sobre las DC constituye un estímulo tan potente como el LPS en la inducción de la maduración de estas células (Tabla 1) [7]. Este bloque de resultados fue sorprendente debido a que se ha reportado que el gangliósido GM3, altísimamente representado en el VSSP, inhibe la

maduración de DC de ambos orígenes. Esta propiedad inmunosupresora del gangliósido fue contrarrestada al combinarse en el VSSP.

Polarización de la respuesta de las células T cooperadoras hacia Th1

En concordancia con la teoría propuesta por Janeway acerca de la función instructiva del sistema inmune innato sobre las células del sistema inmune adaptativo se ha propuesto que los receptores de reconocimiento de patrones expresados en las DC interactúan con sus ligandos y subsecuentemente condicionan la polarización de las células T CD4 a Th1 o Th2. Se ha caracterizado la IL-12 como la citocina secretada por las DC que condiciona una polarización de las células T cooperadoras a Th1. Con el objetivo de evaluar la capacidad del VSSP de inducir la producción de IL-12 por las DC, se evaluaron los niveles intracelulares de la citocina por citometría de flujo. En este experimento se observaron diferencias entre las DC tratadas con VSSP y con LPS. Mientras el 87% de las DC tratadas con VSSP produjeron IL-12, solo el 34% fueron estimuladas por el LPS (Tabla 1) [7].

Para evaluar la capacidad de las DC activadas con VSSP de polarizar linfocitos T CD4 vírgenes a Th1 o Th2, se purificaron estas células del bazo de ratones transgénicos DO.11.10, las cuales son específicas para un péptido caracterizado de OVA. En este experimento, las DC activadas con VSSP promovieron la secreción de IL-2 e INFγ, mientras que la producción de IL-4 fue inhibida (datos no mostrados). Este perfil de citocinas en las células T auxiliares es característico de un patrón Th1.

Activación de los linfocitos T citotóxicos

El efecto potenciador del VSSP sobre las DC y el condicionamiento de respuesta Th1, a pesar de la representatividad del gangliósido en el VSSP, condujeron al diseño de varios experimentos para determinar la capacidad estimuladora de nuestro producto de células T CD8 citotóxicas (CTL, del inglés, *cytotoxic T lymphocytes*). Esta propiedad no había sido descrita anteriormente para las VME de *Neisseria meningitidis*, lo que constituyó un reto para el VSSP. Además, en los últimos años se han evaluado numerosos estímulos para determinar si las células T cooperadoras CD4 se requieren para la generación de respuestas CTL efectivas. Estos estudios han revelado la existencia de respuestas CTL dependientes e independientes de la cooperación de las células CD4. Para evaluar ambos fenómenos con nuestro sistema de adyuvación, se utilizó el ensayo de CTL *in vivo* después de una única dosis de OVA sola o adyuvada con VSSP, y se midió la respuesta específica por el péptido inmunodominante SIINFEKL. Para determinar si la activación de los linfocitos T CD8 ocurría en ausencia de las células T cooperadoras, se midió la respuesta CTL en ratones a los que les fueron eliminadas estas células. La eliminación de las células T CD4 se realizó por un tratamiento sistémico con un AcM específico para esta molécula y se utilizó PBS como control negativo de esta manipulación. Este experimento demostró que el VSSP es capaz de inducir hasta el 40% de la lisis de las células diana positivas a SIINFEKL, incluso en ausencia de las células CD4 (Tabla 2) [8]. Este resultado incluye al VSSP en el grupo de adyuvantes

Tabla 1. Activación de las células dendríticas murinas.

| | CD80 | CD86 | CD40 | MHC II | IL12 p40/p70 |
|--------------------|------|------|------|--------|-----------------|
| DC ⁰ | 34.2 | 34.3 | 61.3 | 29.8 | 0 |
| DC ^{LPS} | 70.7 | 66.8 | 72.5 | 72.5 | 34.1 |
| DC ^{VSSP} | 67.7 | 62.7 | 70.1 | 69.9 | 86.9 |

*Los datos se presentan como porcentaje de las células positivas a los marcadores evaluados.

7. Mesa C, et al. Very small size proteoliposomes derived from *Neisseria meningitidis*: an effective adjuvant for Th1 induction and dendritic cell activation. *Vaccine* 2004;22(23-24):3045-52.

8. Mesa C, Fernández LE. Challenges facing adjuvants for cancer immunotherapy. *Immunol Cell Biol* 2004; 82(6): 644-50.

Tabla 2. Activación de los linfocitos T CD8.

| Vacuna | Tratamiento | Lisis específica a SIINFEKL (%) |
|----------|--------------|---------------------------------|
| OVA | PBS | 2.4 |
| | α CD4 | 2.0 |
| OVA/VSSP | PBS | 42.8 |
| | α CD4 | 46.2 |

que activa la respuesta CTL a Ag exógenos en ausencia de los linfocitos T cooperadores.

Actividad antitumoral

Finalmente, se impuso la evaluación práctica de la capacidad adyuvante del VSSP en un experimento antitumoral. Para ello se utilizó un sistema antigénico diferente a los evaluados para caracterizar al VSSP con vistas a demostrar su gran aplicabilidad. Las vacunas de células tumorales se han investigado ampliamente ya que se asume que contienen todos los Ag tumorales relevantes. En este estudio, la línea tumoral de carcinoma de colon CT26 fue una de las utilizadas para la evaluación. Los resultados en los experimentos de vacunación con esta línea tumoral irradiada y reto con la propia célula viva, mostraron que la utilización de VSSP para adyugar la vacuna celular previno el de-

Tabla 3. Actividad antitumoral.

| Vacuna | Animales con tumor/Total |
|------------|--------------------------|
| PBS | 10/10 |
| CT26* | 9/10 |
| CT26*/VSSP | 1/6 |

sarrollo de los tumores en más del 80% de los animales inmunizados. Este resultado corrobora que el VSSP facilita y aumenta la presentación cruzada natural de las células CT26 apoptóticas e induce la estimulación de células T CD8 específicas (Tabla 3).

El conjunto de resultados que se compilan en este trabajo demuestran que el VSSP, independientemente del predominio del gangliósido en su estructura, provee al SI de las señales de “peligro” necesarias para la activación de las DC y la polarización hacia Th1. Además, este concepto se amplía tras determinar que las señales del VSSP activan y expanden células T CD8 Ag específicas. Este fenómeno se facilita por la presentación cruzada de Ag exógenos y por la independencia de la cooperación de las células CD4 para la expansión primaria de las CD8. Por tanto, el VSSP constituye una buena alternativa de los adyuvantes existentes para el uso en futuras vacunas terapéuticas.