

Evaluación de la inmunogenicidad de una nueva vacuna terapéutica antialérgica adyuvada

Ramírez-González W, Mateo-Morejón M, Reyes-Zamora MC, Reyes-Díaz LM, Gonzalez-Aznar E, Torralba-Averoff D, Lastre-González M, Zaya-Vignier C, Pérez-Martín O, Labrada-Rosado A

Centro Nacional de Biopreparados e Instituto Finlay de Vacunas, La Habana, Cuba

Email: wendy@biocen.cu

RESUMEN

La inmunoterapia alérgeno específica, representa el único método específico de tratamiento del asma alérgica, y con efectividad a largo plazo y potencial para alterar el curso de la enfermedad. El desarrollo de una nueva vacuna terapéutica para el asma alérgica asociada a la sensibilización a ácaros, que sea efectiva con pocas administraciones constituiría una alternativa muy ventajosa con respecto a las vacunas convencionales disponibles. El objetivo de esta investigación fue evaluar la inmunogenicidad en humanos de una vacuna terapéutica de alérgenos de *Dermatophagoides siboney*, adyuvada con proteoliposoma de *Neisseriameningitidis*B (PROLINEM-DS). Se trata de un ensayo clínico fase I, abierto, no controlado, no aleatorizado, en 20 pacientes adultos asmáticos, sensibilizados a *Dermatophagoides siboney*. La vacuna se suministró por vía subcutánea, en un esquema de incremento de dosis con tres dosis efectivas. Se evaluó la respuesta de anticuerpos alérgeno específicos IgE, IgG y subclases. Se determinó la respuesta celular alérgeno-específica de linfocitos de sangre periférica por medio de las citocinas en sobrenadante de cultivo, IL-13, IL-5 (respuesta patológica Th2), INFg (respuesta protectora, Th1) e IL-10 (respuesta protectora Tr1). Disminuyeron los niveles de IgE ($p=0,002$) y aumentaron los de IgG4 ($p=0,015$) a los 84 días. Se redujo significativamente el cociente IgE/IgG4 ($p<0,001$) a los 84 días, con un 85 % de los pacientes con reducción mayor del 20% con respecto a los valores basales. Los niveles de IgG específicos a *N. meningitidis* mostraron aumento significativo ($p=0,0001$). Se demostró un aumento de la secreción de IL10 e INFg, con respecto a los valores basales ($p<0,001$). El cociente IgE/IgG4, IL10 e INFg constituyen promisorios biomarcadores de efectividad. No se afectó negativamente la respuesta preexistente

hacia *N.meningitidis*. El esquema de solo tres dosis efectivas provocó cambios inmunológicos favorables para un tratamiento de inmunoterapia

Palabras clave: Asma, Inmunoterapia alérgeno específica, proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*.

INTRODUCCIÓN

La inmunoterapia alérgeno específica (IT), representa el único método específico de tratamiento del asma alérgica, y con efectividad a largo plazo y potencial para alterar el curso de la enfermedad. Estudios actuales han permitido profundizar en los mecanismos de acción, la teoría más consistente favorece la inducción de una respuesta de células T reguladoras (Treg, Tr1), mediada fundamentalmente por IL-10, aunque no se descarta tampoco el papel de la inducción de una respuesta Th1 moderada como elemento contrarregulador de la respuesta Th2, o como inductor de una respuesta Treg periférica. El empleo de adyuvantes que provean señales al sistema inmunitario innato (particularmente induciendo respuestas de tipo Th1 o Treg) puede potenciar el efecto de las vacunas de alergenos convencionales, con el propósito de lograr una mayor eficacia y una reducción drástica del número de inyecciones y del tiempo de tratamiento. Entre las citocinas Th1, el IFN γ es el más potente supresor de la respuesta Th2 alérgica. Además, la Inmunoterapia induce un incremento de los anticuerpos específicos IgG4 con carácter bloqueador tanto de la respuesta alérgica inmediata (en competencia con la IgE) como de la respuesta alérgica tardía de carácter inflamatorio. El desarrollo de una nueva vacuna terapéutica para el asma alérgica asociada a la sensibilización a ácaros, que sea efectiva con pocas administraciones constituiría una alternativa muy ventajosa con respecto a las vacunas convencionales disponibles y permitiría una mayor extensión del enfoque inmunoterapéutico.

OBJETIVO

General: Evaluar la inmunogenicidad en humanos de una vacuna terapéutica de alergenos de *Dermatophagoides siboney*, adyuvada con proteoliposoma de *Neisseria meningitidis* B (PROLINEM-DS).

Específicos:

1. Determinar los cambios inducidos por la vacuna terapéutica PROLINEM DS en relación con la respuesta inmune humoral (IgE total y específica, IgG específica total y subclases IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, cociente IgE/IgG4).
2. Determinar los cambios en la respuesta preexistente de anticuerpos IgG séricos contra proteínas de *Neisseria meningitidis*.
3. Determinar los cambios en la respuesta celular alérgeno-específica de linfocitos de sangre periférica, mediante la evaluación de las citocinas en sobrenadante de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se trata de un ensayo clínico fase I, abierto, no controlado, no aleatorizado, en 20 pacientes adultos asmáticos, sensibilizados a *Dermatophagoides siboney*. La vacuna se suministró por vía subcutánea, en un esquema de incremento de dosis con tres dosis efectivas (1.2, 2 y 4 µg de Der s1).

Se evaluó la inmunogenicidad pre tratamiento, a los 42 días (dos semanas después de la tercera dosis) y 84 días de iniciado el estudio (dos meses después de la tercera dosis).

Se realizó la cuantificación de los niveles séricos de anticuerpos por ELISA. Para la cuantificación de IgE total se empleó un estuche comercial siguiendo las instrucciones del proveedor (SUMA, Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba).

Para la cuantificación de IgE, IgG y subclases alérgeno-específicos se realizó ELISA indirecto, con antígeno fijado a la fase sólida (extracto alérgico *D. siboney* a 1000 UB/mL). Se emplearon conjugados anti-IgE, anti-IgG o anti subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanas biotinilados (SIGMA), dilución 1:1000 y Streptavidina-Peroxidasa (Boehringer Mannheim) en una dilución 1:10000. Sustrato TMB, 1 mg/mL y H₂O₂, 30% en tampón Citrato 0,1mol/L - Fosfato 0,2 mol/L. La respuesta de anticuerpos IgG contra los antígenos de *Neisseria meningitidis*, se realizó ELISA indirecto, con proteínas purificadas de la membrana externa del meningococo B (20 µg/ml) fijado

a la fase sólida. Se empleó conjugado anti-IgG humano (SIGMA), dilución 1:2000 y sustrato paranitrofenil fosfato 1mg/mL en buffer Tris. En todos casos se leyó la absorbancia a 405 nm.

Se determinó la respuesta celular alérgeno-específica de linfocitos de sangre periférica por medio de las citocinas en sobrenadante de cultivo, IL-4, IL-5 (respuesta patológica Th2), INFg (respuesta protectora, Th1) e IL-10 (respuesta protectora Tr1) antes y después de la vacunación terapéutica. Las células mononucleares se aislaron de la sangre mediante centrifugación en gradiente de Fycoll/Hypaque (2500 rpm 30 min, 4°C). Las células aisladas por centrifugación se ajustaron a una densidad de $1-5 \times 10^6$ células/mL. Se emplearon al menos dos pozos para su cultivo en placas por cada condición experimental: ausencia de estímulo, estímulo específico con 5 µg/mL de Der s 1 purificado, libre de LPS (BIOCEN), y estímulo específico con proteoliposoma. Se cultivaron durante cinco días a 37°C en atmósfera húmeda con 5 % de CO₂ y se comprobó el grado de proliferación mediante incubación con el reactivo colorimétrico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) 2,5 diphenyltetrazolium bromide), 5 mg/mL y lectura espectrofotométrica a 550 nm. Antes de la adición de MTT se tomaron muestras de sobrenadante de cultivo para los ELISA de citocinas. Se emplearon los ELISA comerciales para IL-13, IL-5, INFg e IL-10 (Bender Medsystems). La concentración de cada citocina se expresó en ng/mL de acuerdo a los patrones comerciales.

El procesamiento estadístico se realizó al final del estudio por analistas no vinculados al ensayo. Se empleó el programa Microsoft Excel 2013 y el software estadístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) versión PASW Statistics 18. Se emplearon métodos no-paramétricos excepto en las variables en las que se demostró ajuste a la normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p < 0.05$). El nivel de significación estadística fue en todos los casos de 0.05.

RESULTADOS

No existieron cambios en relación a la IgE total, la IgG alérgeno específica total, y las subclases IgG2 e IgG3. En el caso de la subclase IgG1 respecto a los valores basales 271,66 (IC 95 %: 222,21-653,50) hay un aumento de los valores obtenidos en tiempo 42 (366,82; IC 95 %: 300,79-501,88) y tiempo 84 días (441,43; IC 95 %: 242,35-1454,62), siendo ligeramente significativo a

los 42 días ($p=0,044$ Wilconxon matched pairs test). Respecto a los valores basales de IgE alérgeno específica 851,56 (IC 95 %: 166,77-2836,20) se aprecia una reducción en los valores obtenidos en tiempo 42 (559,72; IC 95 %: 144,82-3428,34) y tiempo 84 días (366,84, IC 95 %: 110,71-2397,29), que es estadísticamente significativo a los 84 días ($p=0,002$ Wilconxon para muestras pareadas) y un aumento de IgG4 respecto a los valores basales 481,85 (IC 95 %: 135,4-1254,94), que muestra un valor a los 42 días (903,75; IC 95 %: 137,09-3197,48) estadísticamente significativo ($p<0,001$ Wilconxon para muestras pruebas), manteniéndose este aumento significativo (857,02; IC 95 %: 132,17-3630,37) a los 84 días ($p=0,015$ Wilconxon para muestras pruebas) Se redujo significativamente el cociente IgE/IgG4 ($p<0,001$ Wilconxon para muestras pruebas) a los 84 días, con un 85 % de los pacientes con reducción mayor del 20 % con respecto a los valores basales. La actividad bloqueadora de la IgG4 sobre la IgE, ha sido propuesta por algunos autores como predictor de efecto clínico. El efecto bloqueador de la IgG se ha documentado bien con la subclase IgG4 pero es posible también con otras subclases de IgG inducidas por estimulación Th1 como es el caso de la IgG1, el incremento en los niveles de IgG1 alérgeno específica observado resulta entonces beneficioso y en correspondencia con los efectos proTh1 del adyuvante proteoliposoma de *Neisseria meningitidis B*, presente en la formulación de la vacuna. Los resultados muestran que la inclusión de adyuvantes en la IT puede producir una reacción inmunológica más temprana que la observada con vacunas no adyuvadas.

Todos los pacientes del estudio tenían antecedente de haber sido vacunados previamente con la vacuna profiláctica contra la enfermedad meningocócica VA-MENGOC BC. PROLINEM DS contiene como adyuvante AFPL1 (proteoliposoma de *Neisseria meningitidis*), por tanto la determinación de anticuerpos IgG específicos a proteínas de *N. meningitidis* se emplea como variable de seguridad para determinar en qué medida la vacuna antialérgica modifica una respuesta anti-meningocócica preexistente. Los niveles de IgG específicos a *N. meningitidis* mostraron aumento significativo con respecto a los valores basales, a los 42 días y más apreciable aún a los 84 días ($p=0,0001$ Wilconxon para muestras pruebas). Lejos de afectar negativamente la respuesta antimeningocócica protectora preexistente, PROLINEM DS se comporta como una dosis de refuerzo.

Las concentraciones de IL13 e IL5, expresión de un patrón Th2, fueron indetectables en todos los tiempos evaluados. Aunque las concentraciones de INFg e IL10 se movieron en un rango amplio debido a la variabilidad inter sujeto, se demostró un aumento estadísticamente significativo con respecto a los valores basales en los dos tiempos analizados (en todos los casos $p < 0,001$ t Student, datos pareados). Es apreciable el aumento en la concentración de dichas citocinas en el sobrenadante de cultivo de las células estimuladas con DS o con PL respectivamente con respecto a las no estimuladas (figura).

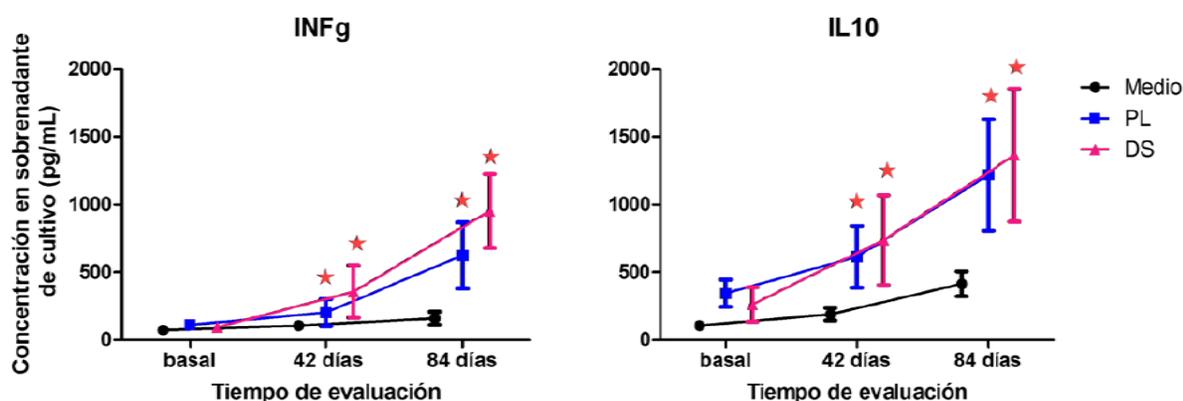


Figura. Concentración en sobrenadante de cultivo de INFg e IL10. Media e intervalo de confianza del 95%. (★) Diferencia significativa $p < 0,05$ con respecto a $t=0$ (t Student, datos pareados)

Los resultados del ensayo, concuerdan con otros estudios con vacunas antialérgicas adyuvadas, que han evidenciado un aumento temprano en la producción tanto de IL10 como de INFg. Se han reportado estudios que evidencian que la IL10 juega un papel fundamental por sus acciones supresoras tanto sobre linfocitos Th2 como sobre Th1. Los mecanismos subyacentes en la acción del IFN γ comprenden la supresión de la liberación de citocinas de tipo Th2 por las células T

activadas. Los resultados son compatibles con una respuesta temprana a la inmunoterapia dominada por un mecanismo T regulador que disminuye tanto los efectos Th2 como Th1 y posteriormente una desviación hacia un patrón Th1 semejante. No sería descabellado pensar que un adyuvante podría acelerar esta evolución. La inducción preferencial de una respuesta inmune polarizada hacia un patrón Th1 del AFPL1 utilizado como adyuvante en PROLINEM DS explican los resultados obtenidos.

CONCLUSIONES

El cociente IgE/IgG4 y la respuesta de las citocinas IL10 e INFg constituyen promisorios biomarcadores de efecto. No se afectó negativamente la respuesta preexistente hacia *Neisseria meningitidis*. El esquema de solo tres dosis efectivas provocó cambios inmunológicos favorables para un tratamiento de inmunoterapia alérgeno específica.

RECOMENDACIONES

Proseguir el desarrollo de este producto prometedor en el campo de inmunoterapia alérgeno específica, con la realización de ensayos clínicos fase II de dosis respuesta.

BIBLIOGRAFÍA

1. Diaz A, Labrada A, Castro RL, Álvarez M. Current status and future perspectives of immunotherapy in Latin America and Cuba. J World Allergy Org. 2014; 7:28. doi:10.1186/1939-4551-7-28
2. Pérez O, Lastre M. Proteoliposoma: corazón de VA-MENGOC-BC® y plataforma de adyuvantes. VacciMonitor. 2013; 22(3):1-3.

3. Mohammadi-Shahrokhi V, Rezaei A, Andalib A, Rahnama A, Jafarzadeh A, Eskandaril N. Immunomodulatory Effects of Adjuvants CPG, MPLA, and BCG on the Derp2-Induced Acute Asthma at Early Life in an Animal Model of BALB/c Mice Inflammation. 2017 Feb; 40(1):259-274. doi: 10.1007/s10753-016-0476-2.
4. Akdis M, Akdis C. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: Multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2014; 133: 621-31. doi: 10.1016/j.jaci.2013.12.1088.
5. Lai X , Li J, Xiao X, Liu E, Zhang C, Wang H, et al. Specific IgG4 Production during House Dust Mite Immunotherapy among Age, Gender and Allergic Disease Populations. *Spangfort Int Arch Allergy Immunol*. 2013; 160:37–46.