



Departamento de
BIOQUÍMICA CLÍNICA

Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Nacional de Córdoba

C I B I C I

Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas,
Departamento de Bioquímica Clínica
Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI-
CONICET

Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias Químicas

**Estudio de la capacidad adyuvante del CpG-ODN
formulado en una nanoestructura en fase coagel para
la inducción de inmunidad humoral y celular
mediada por linfocitos T CD8**

Licenciada en Bioquímica: Ana Laura Chiodetti

Directora de Tesis: Dra. Belkys Angélica Maletto

Córdoba, Argentina

2017

Directora de tesis:

Dra. Belkys Angélica Maletto

Comisión Asesora:

Dra. Mariana Maccioni

Dr. Fernando Irazoqui

Dr. Daniel Allemandi

Comisión Evaluadora:

Dra. Mariana Maccioni

Dr. Fernando Irazoqui

Dr. Daniel Allemandi

Evaluador externo: Dr. Martín Rumbo

El presente trabajo de tesis fue desarrollado en la Universidad de Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Bioquímica Clínica, Córdoba, Argentina. Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología, CIBICI-CONICET, Córdoba, Argentina

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo económico del Fondo para la Investigación Científica y Tecnológica (FONCyT); Secretaria de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Córdoba (SECyT-UNC); Ministerio de Ciencia y Tecnología de la provincia de Córdoba y por el financiamiento a través de las becas de iniciación de doctorado otorgada por FONCyT, de finalización de doctorado otorgada por el Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y el Programa BECAR Argentina.

A mi mamá, mi papá y mi hermano

Myrna, Gustavo y Fernando

Los pilares de mi vida

A la memoria de mis abuelos, Mima y Tato

Siempre estuvieron y estarán conmigo

A la familia de la vida, mis amigos

AGRADECIMIENTOS

Mi más grande agradecimiento a toda mi familia, quienes me apoyaron siempre en todos los aspectos posibles para desarrollar esta carrera, hoy estoy acá indudablemente gracias a ellos. Mi principal agradecimiento a mi abuela Mima, con quién desearía muchísimo poder compartir este día, pero sin duda estará más presente que nunca.

A los amigos que hice en La Plata, donde todo comenzó, con quienes guardo los mejores recuerdos y a pesar de no poder vernos tan frecuentemente como quisiera, siempre estarán ahí para lo que sea.

Por sobre todas las cosas, agradezco a mis compañeros del CIBICI, investigadores, personal de apoyo de CONICET, bioteristas y principalmente a mis compañeros becarios que me enseñaron todo lo que sé, quienes siempre estuvieron para contestar cada pregunta, discutir cada inquietud y con quienes compartí la mayor parte de mi vida durante los últimos 5 años.

A mi directora, Belkys, quién me dio la oportunidad de formarme e iniciar con esta carrera que me apasiona y sin quien indudablemente hoy no estaría acá.

A Gabriel y Cristina, de quienes aprendí muchísimo y siempre estuvieron para ayudarme con cualquier inquietud.

A mis primeras compañeras del laboratorio 108: Fer, Flor, Estefi e Ine, que estuvieron ahí en la mayor parte de mi doctorado. Ellas fueron sin duda la mayor influencia en mi formación y siempre les estaré agradecida por todas sus enseñanzas.

A mis contemporáneas con quienes realizamos el doctorado a la par desde el primer hasta el último día, Rachel “la mocosa” y Sofi, con quienes formé una hermosa amistad, me sostuvieron en los momentos más difíciles y celebraron conmigo los más felices. Fue un placer realizar este doctorado con ustedes a mi lado, son realmente dos grandes personas con quienes fue un placer compartir esta etapa de nuestras vidas y a las que sin importar el destino que nos depare, siempre recordaré con el mayor de los cariños. No tengo palabras para agradecerles, pero sin duda tuve suerte en tenerlas conmigo.

A las integrantes más nuevas, Mer y Coti, quienes trajeron sin duda un aire fresco a laboratorio, llenas de felicidad, siempre de buen humor, compartiendo esa chispa con todas nosotras y Santi, el valiente único varón que se atrevió a ingresar al lab 108.

A todos los integrantes del 103, 104 y 9, becarios e investigadores, con quienes conté incondicionalmente, gracias por siempre estar dispuestos a darme una mano con lo que sea. Un especial agradecimiento a Meli y al dúo dinámico Javi y Clau, con quienes también tuve la oportunidad de compartir una amistad fuera del CIBICI.

A Paula y Pili, dos personas excelentes, por su enorme paciencia y humor, les debo todos mis conocimientos sobre citometría.

Realmente, son innumerables las personas que hicieron posible cumplir esta parte de mi vida, he aprendido muchísimo de mis compañeros e investigadores del CIBICI y espero poder continuar con esta carrera hermosa y devolver algún día, al menos una mínima porción de todo lo que me dieron.

¡GRACIAS!

TABLA DE CONTENIDOS

	Página
Abreviaturas y Acrónimos _____	x
Resumen _____	xiv
Summary _____	xvi
Listado de Tablas y Figuras _____	xviii
Introducción	
-Conceptos generales de vacunas _____	2
-Conceptos básicos del sistema inmune sobre el cuál actúan las vacunas _____	2
-Metas por lograr en una vacuna ideal _____	4
-Desde las vacunas tradicionales hasta las vacunas de la nueva generación: ¿por qué surge la necesidad de cambiar el diseño inicial de las vacunas históricamente utilizadas? _____	4
-El nuevo protagonismo de los adyuvantes: ¿por qué es tan importante el uso de adyuvantes en las vacunas modernas en base a subunidades proteicas? _____	6
-Clasificación y mecanismos generales de acción de los adyuvantes _____	8
-Generalidades de los TLRs _____	11
-Mecanismo de activación del receptor TLR9 _____	11
-Distribución celular del TLR9 _____	13
-Clases, características y propiedades inmunoestimulantes de los distintos ligandos agonistas TLR9 _____	14
-Propiedades farmacológicas del CpG-ODN (PS) _____	19
-Efectos adversos del CpG-ODN (PS) en modelos murinos y en humanos _____	19
-Aplicaciones terapéuticas del CpG-ODN _____	20
-Aplicación a enfermedades infecciosas _____	20
-Aplicación en alergias _____	21
-Aplicación en cáncer _____	21
-Desventajas del CpG-ODN _____	24
-Nanoestructura formada por autoensamblaje de palmitato de ascorbilo en fase coagel: Coa-ASC16 _____	26

-Ventajas del Coa-ASC16 _____	28
-Formulación a utilizar en el presente trabajo de tesis_____	28
Antecedentes del Grupo _____	29
Hipótesis _____	31
Objetivos	
Objetivo General _____	33
Objetivos Específicos _____	33
Resultados	
Capítulo I: “Efecto adyuvante sobre la respuesta humoral del CpG-ODN formulado en un sistema nanoestructurado” _____	35
Resultados del Capítulo I _____	38
-Estudio de la capacidad de potenciación de la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 bajo un esquema de tres inmunizaciones_____	39
-Evaluación de la calidad (avidez) de la respuesta inmune humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16_____	40
-Evaluación de la participación de la IL-6 en la potenciación de la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	41
-Análisis de la capacidad de la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 para reducir la dosis de antígeno sin afectar su respuesta protectora_____	42
-Evaluación de la respuesta humoral inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 al reducir el número de inmunizaciones a una sola dosis_____	43
Conclusiones del Capítulo I _____	45
Capítulo II: “Efecto adyuvante sobre la respuesta celular T CD8+ efectora del CpG-ODN formulado en un sistema nanoestructurado” _____	46
Resultados del Capítulo II _____	49
-Respuesta celular T CD8+ inducida por un esquema de tres inmunizaciones_____	50

-Estudio de participación de la vía de señalización mediada por IL-6 en la promoción de una respuesta celular mediada por células T CD8+	51
-Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de la solución OVA/CpG-ODN y sus componentes tras el proceso de calentamiento implicado en el proceso de formulación de OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	52
-Internalización in vivo de OVA/CpG y CpG-ODN por DCs tras inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	54
-Respuesta celular T CD8+ inducida por una sola inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	58
-Análisis de la dependencia de linfocitos Th para promover la respuesta celular T CD8+ tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	58
-Participación de la vía de señalización impartida por IFN-I en la promoción de la respuesta de células T CD8+ inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	60
-Caracterización de la respuesta celular T CD8+ inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	61
-Evaluación de la eficacia de la respuesta mediada por células T CD8+ efectoras inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en un modelo de infección con LM-OVA	66
Conclusiones del Capítulo II	71
Capítulo III: “Efecto adyuvante sobre la respuesta celular T CD8+ de memoria del CpG-ODN formulado en un sistema nanoestructurado”	73
-Proceso fisiológico de inducción de memoria	73
-Definición de memoria general y subgrupos	75
-Memoria en vacunas	77
-Asistencia por medio de células Th en el momento de inducción de la respuesta inmune (priming)	78

-Dosis de antígeno durante el “priming” _____	78
-Proceso inflamatorio durante el “priming” _____	78
-Precusores de memoria _____	79
Resultados del Capítulo III _____	81
-Estudio de precursores de células T CD8+ efectoras y de memoria durante la fase de expansión inducidos tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	82
-Cinética en sangre de la expansión y contracción primaria y expansión secundaria de células T CD8+ tetrámero positivas. Establecimiento del periodo correspondiente a la fase memoria _____	85
-Caracterización de la respuesta celular T DC8+ de memoria inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	88
-Determinación de la eficiencia de la respuesta de memoria celular T CD8+ generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 frente a un modelo de infección con LM-OVA _____	92
Conclusión del Capítulo III _____	96
Discusión _____	97
Conclusión General _____	121
Materiales y Métodos	
-Ratones _____	123
-Reactivos _____	123
-Medios de Cultivo _____	124
-Preparación de las distintas formulaciones con Coa-ASC16 _____	124
-Inmunizaciones _____	125
-Cultivos Celulares _____	126
-Ensayos de ELISA para la determinación de anticuerpos en suero y su avidéz _____	126
-Determinación de citoquinas mediante ELISA sándwich _____	127
-Citometría de Flujo _____	128
-Ensayo de “uptake” in vivo _____	129

-Ensayo de citotoxicidad in vivo_____	129
-PAGE en condiciones no desnaturizantes_____	130
-Ensayo de Hemólisis_____	131
-Bacterias_____	131
-Cuantificación bacteriana y modelos de infección_____	132
-Ensayo de Sobrevida_____	133
-Análisis Estadístico_____	133

Soluciones

1. Soluciones Buffer _____	134
2. Solución utilizada para contar células_____	134
3. Soluciones madre utilizadas en citometría de flujo_____	134
4. Soluciones utilizadas para mediciones de anticuerpos por ELISA_____	135
5. Soluciones utilizadas para mediciones de citoquinas por ELISA_____	135

Referencias Bibliográficas_____	137
--	------------

Publicaciones Científicas_____	151
---------------------------------------	------------

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción

ActA LM-OVA: LM-OVA deficiente en la proteína inductora de actina A

ALR: del inglés; AIM2-like receptor

AP: del inglés, activator protein

APC: célula presentadora de antígeno; del inglés, antigen-presenting cell

ASC16: 6-0-hexanodecanoato palmitato de ascorbilo 16

ASCn: éster de ácido ascórbico y un ácido graso cuya longitud está dada por “n” número carbonos.

BCR: receptor de células B; del inglés, B-Cell Receptor

CCR7: de inglés, C-C Chemokine Receptor 7

CD: cúmulos de diferenciación; del inglés, cluster of differentiation

CFA: adyuvante completo de Freund; del inglés, complete Freund's adjuvant

CFSE: carboxifluoresceínasuccinimidiléster

CpG: citosina-fosfato-guanina

CpG-A: CpG-ODN de clase A

CpG-B: CpG-ODN de clase B

CpG-C: CpG-ODN de clase C

CG: centro germinal

CGG: gamma globulina de pollo; del inglés; chicken gamma globulin

CLR: receptor de lectinas de tipo C; del inglés, C-type lectin receptor

CMC: concentración micelar crítica; del inglés, critic micelar concentration

CMT: temperatura micelar crítica; del inglés, critic micellar temperature

Coa-ASC16: nanoestructura de tipo cristal líquido derivada del palmitato de ascorbilo 16

CpG-ODN: oligodeoxinucleótido sintético que contiene motivos CpG no metilados

DAI: del inglés, DNA-dependent activator of IFN-regulatory factors

DAMP: patrón molecular asociado a daño; del inglés, damage-associated molecular pattern

DC: célula dendrítica; del inglés, dendritic cell

DNA: ácido desoxirribonucleico; del inglés, deoxyribonucleic acid

DNP: del inglés, 2,4-dinitrofenol

DPECs: células efectoras doble positivas; del inglés, double-positive effector cells

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético; del inglés, ethylenediaminetetraacetic acid

EECs: células efectoras tempranas; del inglés, Early Effector Cells

ELISA: enzimoimmunoensayo; del inglés, enzyme linked immunosorbent assay

FDA: del inglés, Food and Drug Administration

GRAS: del inglés, generally referred as safe

HBSS: solución buffer de Hanks; del inglés, Hank's balanced salt solution

IFA: adyuvante incompleto de Freund; del inglés incomplete Freund's adjuvant

IFI: del inglés, gamma-interferon-inducible protein Ifi-16

IFN: interferón

IRAK: del inglés IL-1 receptor-associated kinase

IRF: factor regulador de interferón; del inglés, interferon regulatory factor

i.v.: intravenosa

KLRG1: del inglés, killer cell lectin-like receptor

KSCN: tiocianato de potasio

LCMV: del inglés, lymphocytic choriomeningitis virus

LN: ganglio linfático; del inglés, lymph node

LM-OVA: *Listeria monocytogenes* genéticamente modificada para expresar OVA

LPS: lipopolisacárido

LRO: organelas relacionadas con lisosomas; del inglés lysosome-related organelles

LRR: múltiples repeticiones ricas en leucina; del inglés leucine-rich repeats

MAPK: quinasas activadas por mitógenos; del inglés mitogen-activated protein kinase

MBL: del inglés, mannose-binding lectin

MDA: del inglés, melanoma differentiation-associated protein 5

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; del inglés, major histocompatibility complex

Mincle: del inglés, macrophage inducible Ca²⁺-dependent lectin

MPECs: células efectoras precursoras de memoria; del inglés, memory precursor effector cells

MPL: monofosforil lípido A; del inglés, monophosphoryl lipid A

MR: del inglés, mineralcorticoid receptor

MyD88: gen de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88; del inglés, myeloid differentiation primary response gene 88

NF-κB: factor nuclear κB; del inglés, nuclear factor κB

NK: del inglés, natural killer

NLR: receptor que contiene un dominio de unión a nucleótidos y repeticiones de leucinas; del inglés, nucleotide-binding domain and leucine rich repeat-containing receptor

NOD: del inglés, nucleotide-binding oligomerization domain

NP: del inglés, 4-hidroxi-3-nitrofenil-acetil

ODN: oligodeoxinucleótido

OVA: albúmina de huevo de gallina; del inglés ovalbumin

PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida; del inglés, polyacrilamide gel electrophoresis

PAMP: patrón molecular asociado a patógeno; del inglés, Pathogen Associated Molecular Pattern

PBS: solución buffer de fosfatos; del inglés, phosphate balanced solution

pDC: célula dendrítica plasmacitoide; del inglés, plasmacitoid dendritic cell

PLGA: ácido poli(láctico-co-glicólico); del inglés, poly(lactic-co-glycolic acid)

PO: enlace fosfodiéster

PRAT4A: del inglés, protein associated with TLR4

PRR: receptor de reconocimiento de patrones; del inglés pattern recognition receptor

PS: enlace fosforotioato

RE: retículo endoplasmático

RIG-I: del inglés, retinoic acid-inducible gene-I

RLR: receptor tipo RIG-I; del inglés, RIG-I like receptor

RNA: ácido ribonucleico; del inglés, ribonucleic acid

s.c.: subcutáneo

SFB: suero fetal bovino

SLECs: células efectoras de corta vida; del inglés, short live effector cells

TCR: receptor de células T; del inglés, T Cell Receptor

T_{CM}: células T de memoria central; del inglés, central memory T cells

T_{EM}: células T de memoria efectora; del inglés, effector memory T cells

T_{MR}: Células de memoria residentes de tejido; del inglés, Tissue-resident memory T cells

Th: del inglés, T helper

Tfh: T helper foliculares; del inglés, follicular helper T cell

TIR: receptor de interleuquina tipo I; del inglés, toll-interleukin-1 receptor

TLR: receptor tipo Toll; del inglés toll-like receptor

TNF: factor de necrosis tumoral; del inglés, tumoral necrosis factor

TRAF6: del inglés, TNF receptor-associated factor 6

TREM: del inglés, triggering receptor expressed on myeloid cell

UNC93B1: unc-93 homóloga B1; del inglés, uncoordinated 93 homolog B1

UFC: unidades formadoras de colonias

WT: salvaje; del inglés wild type

RESUMEN

Durante las últimas décadas se han comenzado a desarrollar las denominadas “vacunas de la nueva generación”. Su diseño difiere de las vacunas tradicionales y está basado en el uso de antígenos altamente purificados o recombinantes débilmente inmunogénicos combinados con poderosas estrategias adyuvantes capaces de compensar esta pérdida de inmunogenicidad. Adicionalmente el mayor problema de los adyuvantes licenciados para uso humano recae en su incapacidad de generar una respuesta del tipo celular Th1 y T CD8+ citotóxica adecuada para proteger contra patógenos intracelulares que perdure en el tiempo. El oligodeoxinucleótido con motivos citocina fosfato guanina no metilados (CpG-ODN), ligando sintético agonista del receptor de la respuesta inmune innata tipo toll 9 (TLR9), ha sido ampliamente considerado por sus efectos inmunoestimulantes como un candidato ideal como adyuvante. El CpG-ODN tiene la capacidad de generar una respuesta humoral y adicionalmente polarizar la respuesta inmune celular hacia un perfil Th1, induciendo también, bajo ciertas modalidades, células T CD8+ citotóxicas. Sin embargo, padece de una biodisponibilidad reducida, lo cual afecta su desempeño. Con el objetivo de optimizar su actividad adyuvante, proponemos una nueva estrategia de formulación para el CpG-ODN basado en un sistema nanoestructurado derivado de palmitato de ascorbilo (Coa-ASC16). En este trabajo, demostramos el potencial de una formulación constituida por ovoalbúmina (OVA), CpG-ODN y el Coa-ASC16 (OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16) para generar una respuesta humoral superior en magnitud y calidad que la solución OVA/CpG-ODN. La magnitud de dicha respuesta humoral resultó ser independiente de la vía de señalización mediada por IL-6. Además, la inmunización con OVA/CpG-ODN fue capaz de inducir una robusta respuesta de células T CD8+ citotóxicas efectoras, dependiente de interferones tipo I e independiente de IL-6 y de la asistencia mediada por células T CD4+. Consistentemente con esos resultados, la estrategia adyuvante demostró promover la internalización simultánea de OVA y CpG-ODN por células dendríticas. En adición, también fue capaz de inducir una buena respuesta de células T CD8+ de memoria. Ambas respuestas celulares T CD8+, efectora

y de memoria, probaron su eficiencia protegiendo contra un modelo de infección intracelular con *Listeria monocytogenes*. Por otra parte, esta plataforma permite la reducción del número de inmunizaciones y la dosis antigénica sin afectar significativamente la inmunidad humoral o celular generada. Estos resultados demuestran el potencial de esta innovadora estrategia adyuvante para el desarrollo de futuras vacunas.

Palabras Clave

CpG-ODN

Adyuvante

Palmitato de ascorbilo

Nanonoestructura

Vacuna

SUMMARY

During the last decades, several groups have begun to develop a new type of vaccines referred as “vaccines of the next generation”. Its design differs from traditional vaccines and is based on the use of highly purified antigens that are poorly immunogenic combined with powerful adjuvant strategies capable of compensating for the loss of immunogenicity. Additionally, the mayor problem of licensed adjuvants for human use is their inability to generate an appropriate long-lasting cellular response, specially mediated by cytotoxic CD8⁺ T cells, to protect against intracellular pathogens. The synthetic ligand for the innate receptor Toll-like 9 (TLR9), a non-methylated cytosine-phosphate-guanine oligodeoxynucleotide (CpG-ODN), has been considered as an ideal adjuvant candidate. It has proven to have the ability to generate a humoral immunity while additionally polarizing the cellular immune response towards a Th1 profile and, under certain conditions, inducing a cytotoxic T CD8⁺ response. However, it has a reduced bioavailability which affects its performance. To optimize its adjuvant activity, we propose a new formulation strategy for CpG-ODN based on a nanostructured system derived from the ascorbyl palmitate (Coa-ASC16). In this work, using ovalbumin (OVA) as a protein antigen, we demonstrated the potential of the OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 formulation to generate a superior humoral response in quantity and quality than the OVA/CpG-ODN in solution. The magnitude of the previously mentioned humoral response was found to be independent of the IL-6 mediated signaling pathway. In addition, immunization with OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 was able to induce a robust CD8⁺ T cell response, dependent on type I IFN and independent from IL-6 signaling and CD4⁺ T cells assistance. Consistently with these results, this adjuvant strategy was shown to promote the simultaneous internalization of OVA and CpG-ODN by dendritic cells. In addition, it was also able to induce an efficient CD8⁺ T cell memory response. Both effector and memory CD8⁺ T cell responses proved to be effective in protecting against an infection model by the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. In addition, this platform allows the reduction of the number of immunizations and the antigenic dose without significantly affecting the humoral or cellular response

generated. These results demonstrate the potential of this innovative adjuvant strategy for the development of future vaccines.

Key Words

CpG-ODN

Adjuvant

Ascorbyl palmitate

Nanostructure

Vaccine

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS

Tablas	Página
Tabla I: Adyuvantes licenciados para uso humano _____	7
Tabla II: Clases de CpG-ODN y características inmunoestimulantes _____	18
Tabla III: Ensayos clínicos utilizando CpG-ODN como adyuvantes de vacunas contra enfermedades infecciosas _____	23
Tabla IV: Ensayos clínicos utilizando CpG-ODN como adyuvantes de vacunas contra diferentes clases de cáncer _____	24

Figuras

Figura 1. Desarrollo de vacunas a lo largo del tiempo _____	5
Figura 2. Principales familias de receptores de reconocimiento de patrones _____	8
Figura 3. Mecanismos de acción propuestos para adyuvantes _____	10
Figura 4. Esquema de las posibles vías de señalización de CpG-ODN/TLR9 _____	13
Figura 5. Efectos inmunoestimulatorios de CpG-ODN _____	15
Figura 6. Esqueleto del oligodeoxinucléido nativo y modificado _____	16
Figura 7. Fotografías obtenidas para observar macroscópicamente los distintos pasos de formación del coagel _____	26
Figura 8. Esquema de la estructura química de ASCn. Estructura química de 6-0-hexadecanoato de ascorbilo 16 (ASC16). Esquema de la fase coagel en equilibrio con la fase gel para ASCn con $n > 12$ _____	27
Figura 1.1. Potenciación de la respuesta humoral por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	40
Figura 1.2. Incremento en la calidad de la respuesta inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	41
Figura 1.3. Estudio de la participación de la vía de señalización mediada por IL-6 sobre la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	40
Figura 1.4. Capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para reducir la dosis de antígeno sin afectar la actividad adyuvante _____	43
Figura 1.5. Respuesta humoral inducida con una única dosis de OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	44

Figura 2.1. Capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir una respuesta celular T CD8+ con un esquema de tres inmunizaciones _____	51
Figura 2.2. Estudio de la participación de la vía de señalización por medio de IL-6 en la generación de la respuesta celular T CD8+ inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	52
Figura 2.3. PAGE en condiciones nativas de los distintos componentes de la formulación. Capacidad hemolítica del coagel _____	54
Figura 2.4. Captura in vivo de OVA y CpG-ODN por DCs con diferentes estrategias adyuvantes _____	56
Figura 2.5. Capacidad de la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir una respuesta celular T CD8+ con una única dosis _____	57
Figura 2.6. La actividad citotóxica inducida tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 está exclusivamente mediada por células T CD8+ _____	58
Figura 2.7. Estudio de la participación de células Th en la generación de la respuesta celular T CD8+ efectora tras inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	59
Figura 2.8. Estudio de la dependencia de la vía de señalización mediada por IFN-I para la generación de la respuesta celular T CD8+ inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	61
Figura 2.9. Magnitud de la respuesta celular T CD8+ inducida tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	63
Figura 2.10. Calidad de la respuesta celular T CD8+ efectora inducida tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 _____	65
Figura 2.11. Estrategia de gating utilizada para el análisis de la producción de citoquinas intracelulares por células T CD8+ mostrado en Fig. 2.10 _____	66
Figura 2.12. Magnitud de la respuesta celular T CD8+ inducida por diferentes estrategias adyuvantes frente a una infección con <i>LM-OVA</i> _____	68
Figura 2.13. Calidad de la respuesta celular T CD8+ inducida por diferentes estrategias adyuvantes frente a una infección con <i>LM-OVA</i> _____	70

Figura 2.14. Estrategia de gating utilizada para el análisis de producción de citoquinas intracelulares y grado de desgranulación en células T CD8+ mostradas en Fig.2.13	71
Figura 2.15. Carga bacteriana remanente en hígado en animales inmunizados con diferentes estrategias adyuvantes tras infección con <i>LM-OVA</i>	72
Figura 3.1. Cinética de una respuesta celular T	76
Figura 3.2. Subpoblaciones de células T CD8+ tetrámero positivas durante la fase de expansión primaria	84
Figura 3.3. Cinética en sangre de expansión y contracción primaria y secundaria de células T CD8+ tetrámero positivas	87
Figura 3.4. Magnitud de la expansión secundaria de células T CD8+ de memoria inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 tras la infección con $\Delta ActA$ <i>LM-OVA</i>	89
Figura 3.5. Estrategia de gating para el análisis de células T CD8+ tetrámero K ^b -SIINFEKL positivas correspondientes a la Fig. 3.4	90
Figura 3.6. Calidad de la respuesta celular T CD8+ de memoria inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16	91
Figura 3.7. Estrategia de gating utilizada para el análisis de producción de citoquinas intracelular por medio de células T CD8+ utilizado en la Fig. 3.6	92
Figura 3.8. Eficacia de la respuesta celular T CD8+ de memoria inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 frente a un modelo de infección con <i>LM-OVA</i>	94
Figura 3.9. Ensayo de sobrevida frente a una infección con <i>LM-OVA</i> en fase memoria	95

INTRODUCCIÓN

Conceptos generales de vacunas

Las vacunas son consideradas el invento de mayor impacto en la salud mundial en términos de prevención y reducción de morbilidad y mortalidad. Actualmente, la Organización Mundial de la Salud estima que las vacunas previenen anualmente de entre 2 a 3 millones de muertes por enfermedades infecciosas, probando su enorme relevancia a lo largo de las últimas décadas (1). Las mismas, están compuestas por un antígeno (componente que le otorga especificidad) y un adyuvante (del latín “adjuvare”; ayudar) componente que, administrado junto con el antígeno, tiene la meta de promover y dirigir la respuesta inmune hacia el antígeno en cuestión.

Inicialmente, el objetivo principal de las vacunas era generar una respuesta inmune adaptativa eficaz y prolongada en el tiempo que logre proteger contra la exposición frente a un patógeno infeccioso. Sin embargo, durante las últimas décadas, la ciencia ha aportado avances cruciales permitiendo que las vacunas dejen de ser exclusivamente una herramienta profiláctica para comenzar a tomar un rol terapéutico. Es así como, actualmente, también son consideradas para el tratamiento de diferentes patologías como cáncer, alergias e infecciones crónicas.

Conceptos básicos del sistema inmune sobre el cuál actúan las vacunas

Para lograr el diseño de vacunas eficaces, es importante entender cómo funciona naturalmente el sistema inmune para detectar y protegernos constantemente contra agentes infecciosos. Los vertebrados, contamos con un sistema inmune compuesto por dos grandes ramas, el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. Tras la exposición a un agente infeccioso o administración de una vacuna, la activación del sistema inmune innato precede a la generación de una inmunidad adaptativa. El sistema inmune innato cuenta con una diversidad de tipos celulares como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células dendríticas (dendritic cells, DCs) cuya función es interactuar con moléculas extrañas al organismo a través de los denominados receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors, PRRs). Tras la activación de estos receptores, las células del sistema inmune innato fagocitan agentes infecciosos, secretan citoquinas proinflamatorias y atraen o activan otras células a través de la secreción de mensajeros químicos como quimoquinas. Este

proceso lleva a la iniciación de una respuesta inmune adaptativa. El entendimiento y manipulación de esos receptores son la clave en el desarrollo de nuevos sistemas adyuvantes.

En líneas generales, la respuesta inmune adaptativa puede dividirse en dos categorías: humoral y celular. Las células de la respuesta inmune adaptativa responden a regiones específicas de los agentes infecciosos conocidas como epítopes. Uno o más epítopes están contenidos en una molécula de mayor tamaño denominada antígeno. La respuesta “humoral” depende de la actividad de anticuerpos (glicoproteínas) secretados por linfocitos B. Una célula B virgen, contiene el receptor de superficie (B cell receptor, BCR), que varía en sus especificidades. Tras el reconocimiento de un epítotope por el correcto BCR la célula B madura y se diferencia en una célula plasmática productora de anticuerpos específicos de ese epítotope que idealmente protege frente a una infección mediante diferentes mecanismos. Entre ellos, podemos hacer una diferenciación general entre dos líneas de protección, una directa, por neutralización de agentes patógenos o toxinas y una indirecta, por cooperación con la respuesta inmune innata involucrando procesos como la citotoxicidad mediada por anticuerpos, donde los anticuerpos sirven como “marcadores de células infectadas” para alertar al sistema inmune y dirigir su eliminación. El denominado sistema inmune adaptativo “celular”, está basado en la acción de células T. Todas las células nucleadas del organismo cuentan en su superficie con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (mayor histocompatibility complex class I, MHC-I). Cuando las células son infectadas con un patógeno intracelular, se desencadenan ciertos mecanismos por los cuales esas células pueden presentar en su superficie epítopes lineales provenientes de esos microorganismos en un contexto de MHC-I para alertar al sistema inmune de la infección. Entonces, los linfocitos T CD8+ que contienen el receptor de superficie T (T cell receptor, TCR) correspondiente para ese epítotope reconocen al antígeno presentado por la molécula MHC-I sobre la célula infectada y desencadenan su muerte.

Otro grupo de células importantes como objetivo de estudio en el desarrollo de vacunas son las células T CD4+ helper (Th). Las células presentadoras de antígenos (antigen-presenting cells, APCs) tales como DCs, macrófagos y células B son capaces de

fagocitar, procesar y presentar epítopes a las células T CD4+ vírgenes en el contexto MHC-II contribuyendo a su diferenciación a células Th. Las células Th activadas son capaces de estimular tanto células del sistema inmune innato como adaptativo a través de la secreción de citoquinas que modulan al sistema inmune para lograr un tipo de respuesta específica. Basándose en el perfil de las respuestas de citoquinas secretadas, la respuesta Th puede clasificarse principalmente en tres perfiles, Th1, Th2 y Th17. La respuesta perfil Th1 favorecen el desarrollo de la respuesta inmune celular, mientras que el perfil Th2 se asocia a una respuesta predominantemente humoral. La respuesta Th17 se relaciona con la inmunidad antibacteriana y antimicótica en mucosas.

Metas por lograr en una vacuna ideal

Tradicionalmente, el desarrollo de vacunas se ha centrado en el desarrollo de una fuerte respuesta Th2, pero actualmente, los candidatos vacunales se consideran óptimos cuando logran un balance Th1/Th2 (2).

Tras la activación de sus receptores específicos, los linfocitos B y T proliferan y se expanden. Una vez eliminado el antígeno, se contraen para generar una pequeña población de memoria específica. Tras un segundo encuentro con el antígeno, estas células inmunes de memoria reconocerán al patógeno y responderán más rápidamente y en mayor magnitud para eliminar la infección. Este tipo de inmunidad específica de larga vida (memoria), es el objetivo principal de una vacuna profiláctica (2).

Desde las vacunas tradicionales hasta las vacunas de la nueva generación: ¿por qué surge la necesidad de cambiar el diseño inicial de las vacunas históricamente utilizadas?

A pesar de décadas de investigación dedicadas a la elaboración de vacunas, partiendo con Edward Jenner en 1796 hasta la actualidad, la mayoría de las vacunas tradicionales se han desarrollado en base a observaciones empíricas y, por lo tanto, se sabe poco y nada sobre los mecanismos a través de los cuales funcionan.

A pesar del gran éxito de estas vacunas en la reducción de morbilidad y mortalidad mundial, actualmente aún existen numerosas enfermedades infecciosas antiguas, emergentes o reemergentes contra las cuales no existe una vacuna que logre

una protección eficaz. Sumado a esto, la mayoría de las vacunas actuales cubren sólo un cierto grupo etario y en general, pueden ser aplicadas únicamente en personas no inmunocomprometidas, dejando fuera de su alcance a un porcentaje considerable de la población mundial (3). Adicionalmente a los desafíos descritos previamente, las vacunas modernas deben cumplir con estándares de seguridad en los cuales la frecuencia de efectos adversos comparable con la observada en desórdenes genéticos aislados son ahora vistos como inaceptables (4). Por todas estas razones, la necesidad del diseño racional de nuevas vacunas es primordial a nivel mundial.

En paralelo a la necesidad de diseñar nuevas vacunas, los avances tecnológicos, especialmente sobre el uso de DNA recombinante, hicieron posible obtener proteínas antigénicas de organismos que eran incultivables, altamente patogénicos o extremadamente caros para cultivar a gran escala dando lugar al nacimiento de las llamadas vacunas en base a subunidades proteicas (5). Dichas vacunas tienen como antígeno a un péptido o proteína altamente purificada o recombinante perteneciente a algún componente del microorganismo contra el que se quiere inmunizar **(Fig. 1)**.

Las vacunas en base a subunidades reducen el riesgo de efectos secundarios como reversiones espontáneas en vacunas atenuadas y desnaturalización de péptidos antigénicos en vacunas inactivadas y son consideradas, por lo tanto, mucho más seguras (1).

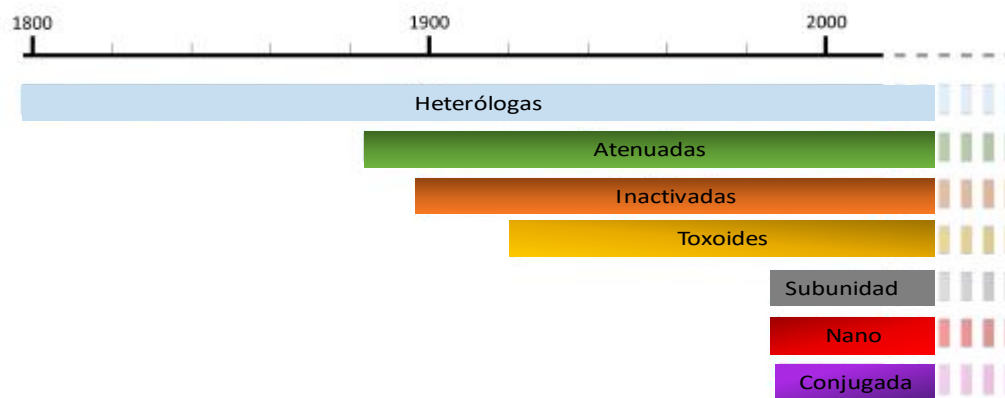


Figura 1. Desarrollo de vacunas a lo largo del tiempo. *Figura adaptada de Karch, 2016 (1)*

Heterólogas: Vacunas que utilizan como antígeno a un microorganismo diferente al patógeno contra el cuál se quiere inmunizar funcionando mediante reacción inmunitaria cruzada con el patógeno. (Ej. Uso del virus de la viruela bovina para proteger contra viruela en humanos)

Atenuadas: Vacunas que utilizan como antígeno microorganismos vivos con capacidad de replicar pero que han sido deshabilitados en el laboratorio para reducir su virulencia.

Inactivadas: Vacunas cuyo antígeno se compone de un microorganismo muerto a causa de un tratamiento físico o químico y es, por lo tanto, es incapaz de replicar.

Toxoides: Consisten en la administración de toxinas bacterianas previamente purificadas e inactivadas por tratamiento con calor, glutaraldehído o formol.

Subunidad: Vacunas cuyo antígeno consiste en un péptido o proteína altamente purificada o recombinante componente del patógeno contra el que se quiere inmunizar.

Nanovacunas: Consisten en nanosistemas que sirven como vehículos o transportadores de antígeno que luego lo liberan en el momento y/o lugar oportuno ante células específicas del sistema inmunológico.

Conjugadas: Consisten en la unión de un polisacárido capsular del patógeno contra el cuál se quiere inmunizar a una proteína transportadora.

El nuevo protagonismo de los adyuvantes; ¿por qué es tan importante el uso de adyuvantes en las vacunas modernas en base a subunidades proteicas?

Actualmente existen diversos candidatos para vacunas en base a subunidades. Sin embargo, a pesar de las ventajas mencionadas, este tipo de vacunas trae aparejado ciertos problemas relacionados fundamentalmente con la pérdida de inmunogenicidad (capacidad de generar una respuesta inmune). Las vacunas tradicionales, utilizan como antígeno a microorganismos enteros atenuados o inactivados que contienen naturalmente múltiples ligandos de PRRs y por lo tanto son altamente inmunogénicos.

En cambio, las vacunas en base a subunidades, al contener como antígeno sólo un péptido o una proteína purificada o recombinante, carecen de multitud de ligandos PRRs y, por lo tanto, no son detectadas por el sistema inmune con la misma intensidad. Es por ello que, a pesar de ser más seguras, son débilmente inmunogénicas. En consecuencia, en ellas, la función del agente adyuvante adquiere una importancia vital para activar la respuesta inmune innata y guiar el tipo de respuesta adaptativa optimizando la inmunidad protectora adquirida para cada patógeno específico (6, 7). Como consecuencia, en las últimas décadas, la investigación en vacunas se ha volcado esencialmente en el estudio de nuevos y complejos sistemas adyuvantes con multitud de funciones. A pesar de más de un centenar de años en investigación, el número actual de adyuvantes licenciados para uso humano sigue siendo muy reducido (**Tabla I**) y, además, poseen ciertas falencias que deben ser superadas. Entre ellas podemos destacar que son débilmente inmunogénicos y, exceptuando a los virosomas, son incapaces de generar una respuesta celular eficiente mediada por linfocitos T CD8+ necesaria para combatir patógenos intracelulares y células tumorales.

Adyuvante	Respuesta inmune activada	Vacunas licenciadas
Aluminio (sales)	Humoral	Múltiples vacunas (ejemplos: Dtap, Hib, Hepatitis A y B)
MF59 (emulsión de aceite en agua)	Balance de repuestas Th1 y Th2	Influenza (Fluad®), H5N1 pre-pandémica (Aflunov®), H1N1 pandémica (Focetria® y Celtura®)
ASO4 (combinación de sales de aluminio + MPL)	Humoral	Virus de Papiloma Humano (Cervarix™, Hepatitis B (Fendrix®)
ASO3 (emulsión de aceite en agua)	Humoral	Virus de la Gripe pandémica (Pandemrix®)
Virosomas	Humoral y Celular (Linfocitos T CD8+ citotóxicos)	Influenza (Inflexal V® e Invivac®), y Hepatitis A (Epaxal®)

Tabla I: Adyuvantes licenciados para uso humano. *Tabla adaptada de Awate, 2013 (8).*

Entre los efectos generales buscados en un adyuvante ideal pueden describirse:

- Aumentar la inmunogenicidad de la vacuna
- Permitir la reducción de dosis de antígeno requerida en la vacuna y/o el número de inmunizaciones

- Ser eficaz en poblaciones con capacidades de respuesta disminuidas debido a la edad (infantes y ancianos), enfermedades o intervenciones terapéuticas
- Ayudar al desarrollo de una respuesta de memoria tanto humoral como celular que persista en el tiempo sin necesidad de refuerzos (memoria)
- Proveer tipos de inmunidad funcionales (promover un perfil de respuesta Th1 sobre Th2, T CD8+ sobre T CD4+ o anticuerpos con isotipos específicos)
- Incrementar la velocidad inicial de respuesta (seroconversión), efecto crítico en situaciones de pandemia

Dentro de los compuestos adyuvantes más estudiados hasta el momento podemos nombrar: sales minerales (principalmente de aluminio), productos microbianos, emulsiones, saponinas, citoquinas, polímeros, micropartículas y nanopartículas como por ejemplo liposomas (9).

Clasificación y mecanismos generales de acción de los adyuvantes

Los adyuvantes pueden clasificarse según propiedades fisicoquímicas, origen o mecanismos de acción. Basados en los mecanismos de acción existen dos grandes grupos, los inmunoestimulantes (sustancias que activan al sistema inmune) y los sistemas o estrategias de formulación y liberación modulada del antígeno (sistemas cuya función es entregar y presentar la vacuna al sistema inmune del hospedador) (10-12). Los mismos, pueden utilizarse aislados o en combinación. Dentro de los agentes inmunoestimulantes más estudiados en el desarrollo de vacunas se encuentran los patrones moleculares asociados a patógenos (pathogen associated molecular patterns, PAMPs). Los PAMPs son estructuras moleculares conservadas en los microorganismos que son reconocidas por multitud de células de la respuesta inmune innata por medio

de los mencionados PRRs; dichos receptores pueden clasificarse como asociados a membranas, solubles o citosólicos. **(Fig.2).**

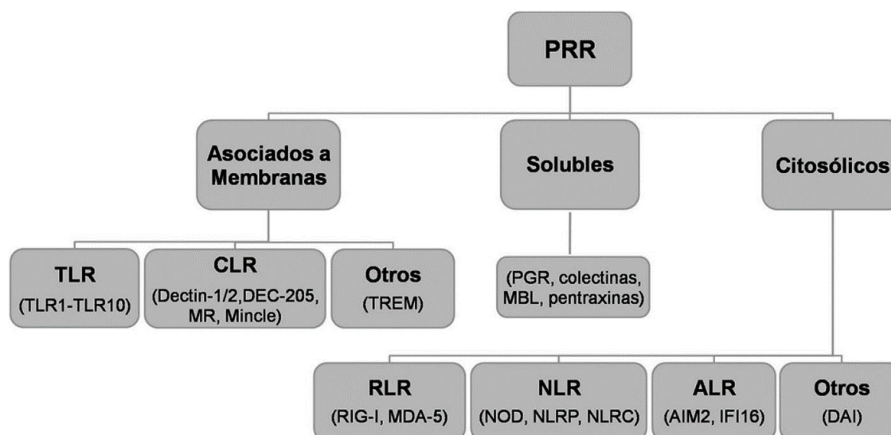


Figura 2. Principales familias de receptores de reconocimiento de patrones, Figura de revisión Juan Carlos Hernández López, 2012 (13)

Los PRRs no sólo son capaces de reconocer microorganismos y sus productos, sino que también se ha demostrado que pueden reconocer señales endógenas de peligro, denominadas colectivamente patrones moleculares asociados al daño (danger-associated molecular patterns, DAMPs). Los ligandos agonistas de PRRs activan las células de la respuesta inmune innata para su maduración y migración a los respectivos tejidos periféricos así como la producción de citoquinas y quimoquinas (14).

Por lo que se conoce hasta el momento, según su naturaleza fisicoquímica y vía de administración, los adyuvantes pueden actuar mediante: 1) generación de un sistema “depot” (liberación lenta y sostenida en el tiempo del antígeno), 2) inducción de expresión local de citoquinas y quimoquinas con consecuente reclutamiento celular en el sitio de inyección, 3) incremento de internalización, procesamiento y presentación antigénica por medio de las APCs, 4) activación y posterior promoción de migración de las APCs hacia los ganglios linfáticos (lymph nodes, LNs). Dichos mecanismos están sumamente relacionados y si bien, se intenta, a modo de estudio, clasificarlos en diferentes grupos, su relación real fisiológica y biológica es prácticamente imposible de separar y por lo tanto, se trata de mecanismos que mayormente operan simultáneamente en combinación (8) **(Fig. 3).**

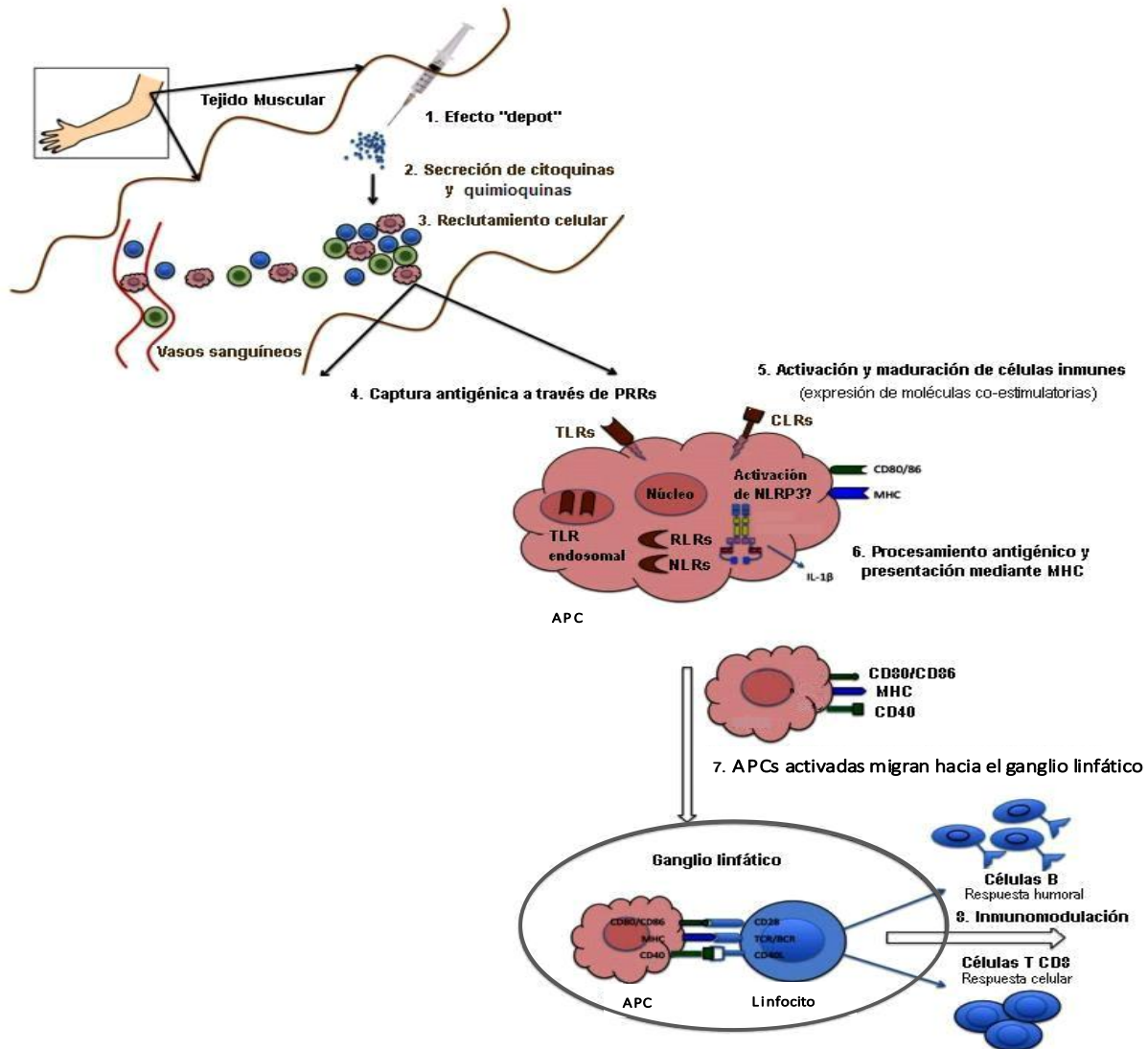


Figura 3. Mecanismos de acción propuestos para adyuvantes. (1) Algunos adyuvantes forman un depósito en el sitio de la inyección, que se asocia con la liberación sostenida en el tiempo del antígeno. (2) Otros adyuvantes se asocian con la secreción transitoria de citoquinas y quimioquinas. (3) Las citoquinas y quimioquinas secretadas están implicadas en el reclutamiento de diversas células inmunes al sitio de inyección. Estas células reclutadas secretan citoquinas y quimioquinas, que, a su vez, atraen a otras células. Todos estos acontecimientos conducen a la formación de un entorno local inmunocompetente en el sitio de inyección. (4) Las APCs reclutadas expresan diversos PRRs, tanto en su superficie (TLRs, CLR) como en su citoplasma (NLRs y RLRs), que se activan con los adyuvantes. (5) Esto lleva a su maduración y activación. Las APCs maduras presentan mayor expresión del MHC y moléculas coestimuladoras. (6) También se caracterizan por el aumento de su capacidad en el procesamiento y presentación de antígenos. (7) Las APCs maduras, luego migran a LN drenantes para interactuar con linfocitos T/B antígeno-específicos. (8) Activan células B productoras de anticuerpos o células T CD8+ efectoras. *Adaptado de Awate, S y col., 2013 (8).*

Los adyuvantes en desarrollo para las vacunas de la nueva generación pueden, como cualquier otro fármaco, requerir de técnicas de formulación que aseguren una óptima biodistribución y farmacocinética para garantizar tanto potencia como seguridad. Por ello, para definir la composición de las vacunas modernas es más adecuado hablar de la combinación de tres componentes: antígeno, adyuvante y formulación, en lugar de sólo antígeno y adyuvante (4).

Los ligandos de los receptores tipo Toll (Toll like receptors, TLRs), pertenecientes a la familia de PRRs, han sido ampliamente estudiados para su explotación en el desarrollo de nuevas estrategias adyuvantes (15). En este trabajo nos vamos a focalizar especialmente en las estrategias que involucran al ligando del receptor TLR9.

Generalidades de los TLRs

Los TLRs son miembros de la familia de glicoproteínas transmembrana tipo I. Hasta el momento se han identificado 10 en humanos y 13 en ratones. Aquellos específicos para moléculas características de patógenos extracelulares, tales como lipopolisacáridos o lipopéptidos, se expresan en la superficie celular (TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6), mientras que los TLRs que detectan patógenos intracelulares se expresan dentro de células inmunes (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) y son específicos para ácidos nucleicos. Tienen una estructura general que consiste en un extremo extracelular N terminal (o ectodominio) rico en motivos repetidos de leucina (leucin-rich repeats, LRRs) que constituye el dominio de unión al ligando, un dominio transmembrana y un dominio citosólico adaptador C terminal que contiene el dominio conservado receptor de interleuquina tipo I (toll-interleukin-1 receptor, TIR). El dominio TIR se une a otros dominios TIR de proteínas adaptadoras como la proteína de diferenciación mieloide 88 (myeloid differentiation protein 88, MyD88) para continuar con la cascada de señalización (16).

Mecanismo de activación del receptor TLR9

El receptor TLR9 reconoce secuencias cortas de DNA denominados oligodeoxinucleótidos (ODNs) que pueden provenir tanto de microorganismos (virus,

bacterias, parásitos) como de células del mismo hospedador (17, 18). En un principio, estaba aceptado que para que una secuencia de DNA sea reconocida por dicho receptor debía contar con motivos citosina fosfato guanina (CpG) no metilados. Esto tenía sentido, dado que dichas características diferencian el DNA bacteriano y viral del correspondiente a los vertebrados y podría lógicamente ser un sistema eficiente para diferenciar el DNA propio del no propio evitando fenómenos de autoinmunidad. Sin embargo, hoy se sabe que la presencia de motivos CpG así como el bajo grado de metilación de dichos motivos no son características estrictamente necesarias para la estimulación de TLR9. La dependencia de los motivos CpG está ligada mayormente a ODNs sintéticos que contienen modificaciones en los enlaces naturales fosfodiéster (PO) (19). El motivo del uso de dichos ODNs modificados en modelos experimentales será abarcado más adelante. Por otro lado, también se ha descrito que el TLR9 es capaz de reconocer DNA propio (metilado)(19). Las razones principales por la cual el DNA propio no estimula al receptor TLR9 se debe a su localización endosomal que impide físicamente la entrada de DNA propio al compartimento donde se encuentra el receptor (20) sumado a la baja concentración de DNA propio con acceso a dicho compartimento debido a la acción de nucleasas endógenas que actúan extracelularmente.

El ligando sintético agonista de TLR9 es un ODN de simple hebra con motivos CpG no metilados y se lo identifica como CpG-ODN. El CpG-ODN entra a la célula por un proceso de endocitosis dependiente de clatrina y luego llega al compartimento endosomal donde toma contacto directo con su receptor TLR9 (21). Por razones que aún se desconocen, la entrada del CpG-ODN a la célula inicia el reclutamiento del TLR9 desde el retículo endoplasmático (RE) hacia los endosomas por medio de la proteína chaperona unc-93 homóloga B1 (uncoordinated 93 homolog B1, UNC93B1) donde sufre una serie de cambios conformacionales en donde participan diferentes proteasas ácidas para llegar a su forma activa capaz de unir MyD88 y continuar su cascada de señalización (22-24). El proceso de proteólisis necesario para la maduración de TLR9 depende de la naturaleza de la célula que lo posee (25). Brevemente, la unión del ligando a su receptor produce un cambio conformacional sobre TLR9 que culmina en la activación de una cascada de señalización con reclutamiento y/o activación de las moléculas adaptadoras MyD88, proteínas quinasas asociadas al receptor de

interlequina 1 (interleuquin-1 receptor-associated kinase-1, IRAK) y posteriormente los factores de transcripción: factor-7 de regulación de interferón (interferon regulatory factor, IRF-7) y factor-6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (tumor-necrosis factor- α receptor activated factor-6, TRAF6) (26-29). Esto finaliza en la rápida activación de una gran variedad de proteínas quinasas activadas por mitógenos (mitogen-activated protein kinases, MAP kinases) (30-32). Todas estas vías convergen en la translocación al núcleo del factor de transcripción nuclear kappa B (nuclear factor kappa B, NF- κ B) para la expresión de citoquinas proinflamatorias, e IRF-7 para la expresión de interferones (IFN) de tipo I (IFN-I o IFN α/β) (33). **(Fig.4).**

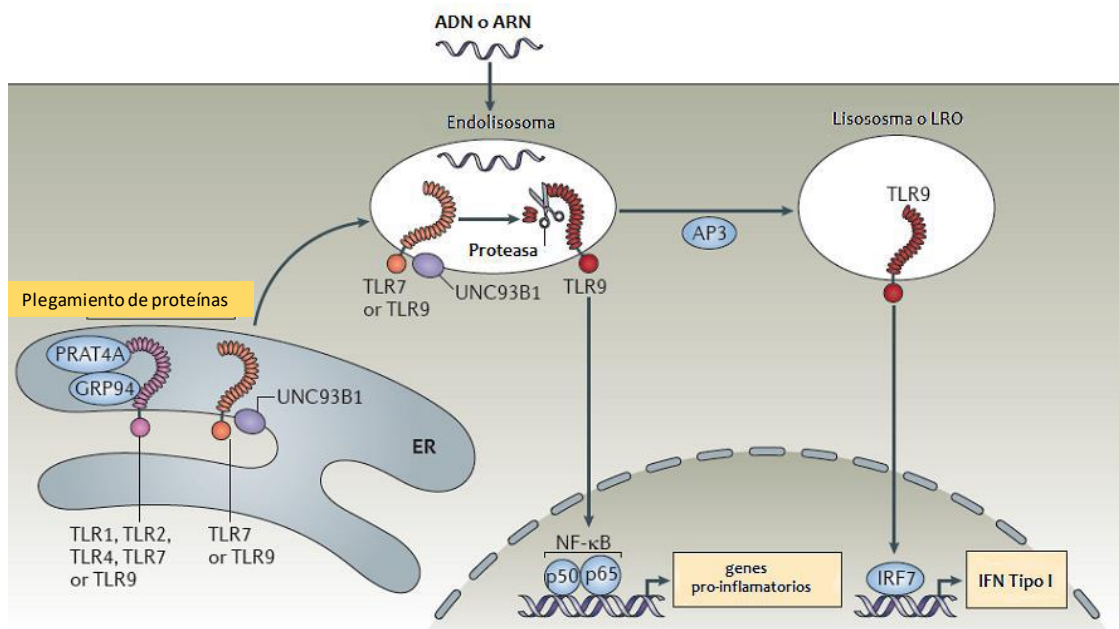


Figura 4. Esquema de las posibles vías de señalización de CpG-ODN/TLR9. (LRO: de la sigla en inglés lysosome-related organelles). *Adaptado de Lee y col. 2012 (34).*

Distribución celular del receptor TLR9

El patrón de expresión del receptor TLR9 difiere entre especies. En humanos, se expresa principalmente en células B y DCs plasmacitoides (plasmacytoid DCs, pDCs) pero también se ha encontrado en neutrófilos activados (35) y células epiteliales pulmonares activadas (36, 37). En ratones, en cambio, se agrega la expresión en prácticamente todas las células de linaje mieloide incluyendo monocitos, macrófagos y DCs convencionales, además de las células B y pDCs (38).

Clases, características y propiedades inmunoestimulantes de los distintos ligandos agonistas de TLR9

El efecto inmunoestimulante del motivo CpG fue descubierto por Krieg en 1995 (39) y desde entonces ha sido objeto de estudio de numerosos grupos de investigación. El CpG-ODN es capaz de activar directamente pDCs y linfocitos B para el incremento de moléculas coestimuladoras, resistencia a apoptosis, incremento de expresión del receptor de quimocina CCR7 y secreción de citoquinas y quimocinas promotoras del perfil de respuesta Th1 (40). De esta manera, contribuye a la inducción de tanto la respuesta inmune innata como adaptativa. Además, la cascada de eventos desencadenada por el CpG-ODN indirectamente apoya la maduración, diferenciación y proliferación de células natural killer (NK), linfocitos T y monocitos/macrófagos (41-45). Dada la distribución del receptor TLR9 en humanos descrita previamente nos focalizaremos en el efecto directo de la activación de dicho receptor sobre células B y pDCs.

Las células B activadas por medio de TLR9 secretan citoquinas con efectos importantes tanto para el sistema inmune innato como adaptativo entre las que se destacan IL-6, IL-10 e IL-12. Este efecto, está mediado por la activación del factor de transcripción NF- κ B (18, 39, 41). La citoquina IL-6 promueve la proliferación y activación de células B, y como resultado, aumenta la producción de anticuerpos (46). Adicionalmente, la activación simultánea de TLR9 y el BCR de una misma célula B, ya sea virgen, de centros germinales (CG) o de memoria induce su diferenciación a célula plasmática productora de anticuerpos (46). Para las células B de memoria, la activación del receptor TLR9 es suficiente para generar su diferenciación a células plasmáticas sin necesidad de señalización por medio del BCR (47). La estimulación de las pDCs por TLR9 se caracteriza por el incremento en la expresión de MHC-II y las moléculas coestimuladoras denominadas como cúmulos de diferenciación (cluster of differentiation, CD): CD40, CD80 y CD86 (48-50) así como por el aumento en la producción de las interleucinas: IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 y el factor de necrosis tumoral alfa (tumoral necrosis factor, TNF- α) (33). También induce su maduración con

incremento de procesamiento y presentación antigénica (40) y producción de IFN-I (51) (**Fig. 5**).

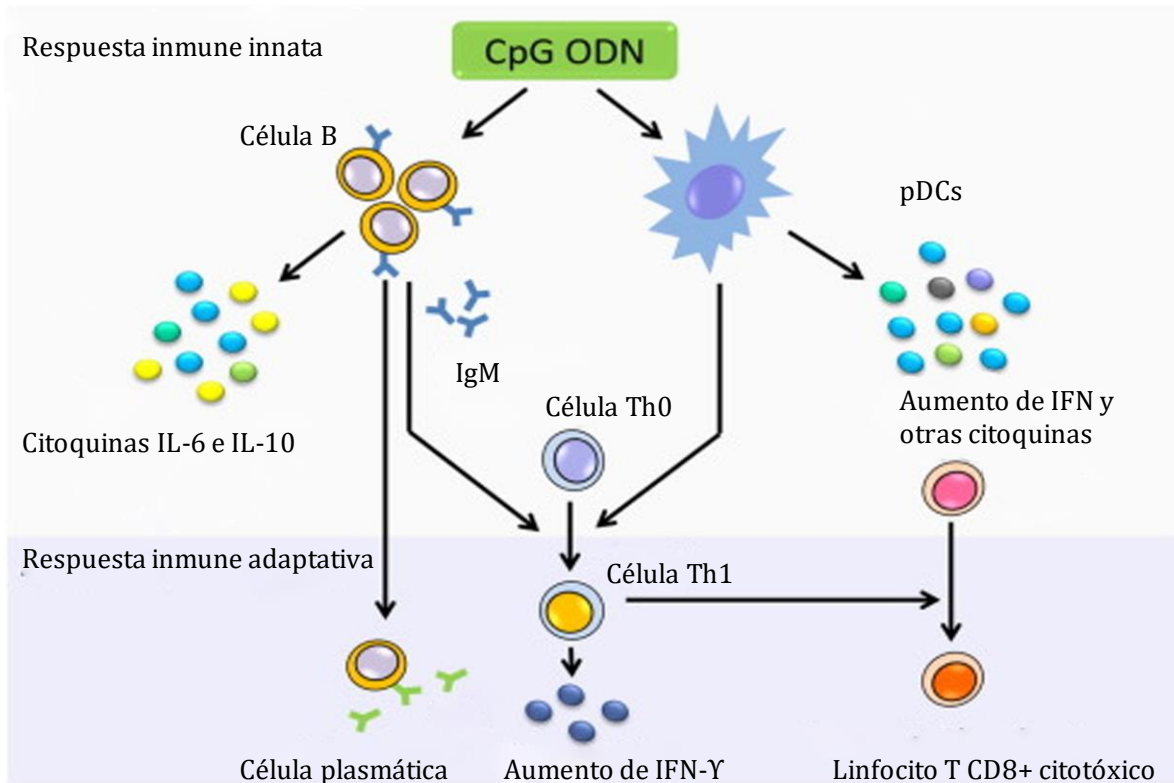


Figura 5. Efectos inmunoestimuladores de CpG-ODN. Adaptado de Zhang, 2017 (52)

Dado que los CpG-ODNs naturales contienen enlaces PO que son fácilmente degradados por DNAsas endógenas (denominados CpG-ODN (PO)), la mayoría de las investigaciones realizadas hasta el momento han utilizado una variedad de ODN resistente a nucleasas (53, 54). Éste, consiste en la modificación del enlace PO que mantiene unida la cadena de ácidos nucleicos reemplazando un oxígeno del grupo fosfato por un azufre resultando en un enlace fosfortioato (PS) denominándose CpG-ODN (PS) (**Fig. 6**).

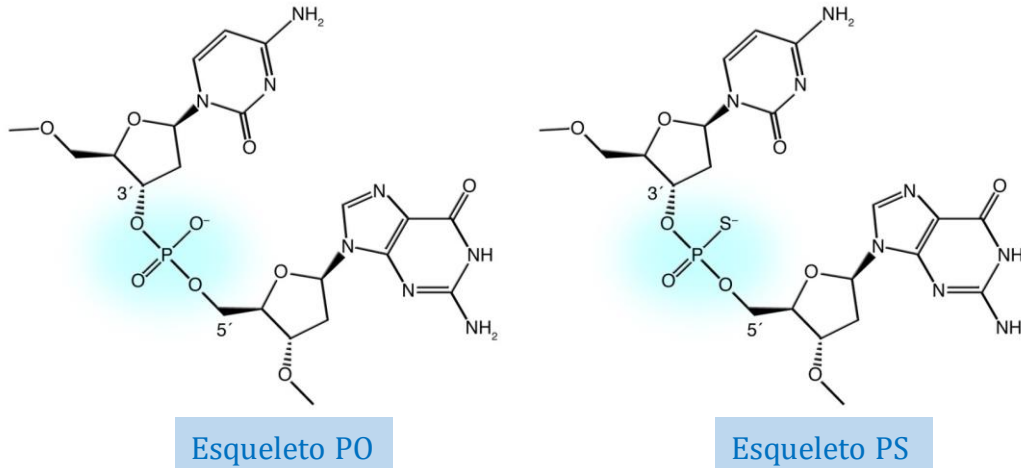


Figura 6. Esqueleto del ODN nativo y modificado. Este último difiere del nativo (PO) en la sustitución de un átomo de azufre por uno de oxígeno. Este cambio mejora la estabilidad *in vivo* del ODN. Adaptado de Krieg y col 2007 (55).

Esta modificación le brinda gran resistencia a la degradación por DNAsas endógenas y por lo tanto aumenta considerablemente su vida media en el sistema una vez administrado (53, 54). Estos CpG-ODN (PS) sintéticamente modificados pueden dividirse en 4 clases o familias, cada una con propiedades estructurales y biológicas diferentes (56) **(Tabla II)**.

El **CpG-ODN clase A** (CpG-A), también denominado clase D, consiste en un ODN simple hebra con motivos CpG palindrómicos en el centro de la secuencia unidos entre sí por enlaces PO. A su vez, contienen secuencias poli(G) con enlaces PS en los extremos 3' y 5'. Esta familia de CpG-ODN activa los receptores TLR9 de las pDCS para la producción de grandes cantidades de IFN- α con la consecuente activación de células NK y producción de IFN- γ (57). Sin embargo, es un pobre inductor de proliferación de células B. (40, 57, 58). Además, debido a sus secuencias palindrómicas y extremos poly(G), es capaz de formar espontáneamente estructuras altamente ordenadas de tamaño nanométrico. Muchos trabajos indican que es esta capacidad de formar multímeros, la que lo convierte en un fuerte inductor de IFN-I (56, 59).

El **CpG-ODN clase B** (CpG-B), también denominado clase K, consiste en un ODN en donde todos los enlaces PO han sido reemplazados por enlaces PS y puede tener diferente número de motivos CpG en su secuencia. Esta clase de CpG-ODN induce fuertemente la proliferación y activación de linfocitos B pero es un pobre inductor de IFN-I por medio de pDCs (40, 58). Su estructura es lineal y es incapaz de formar espontáneamente estructuras ordenadas de tamaño nanométrico como el CpG-A (60).

El **CpG-ODN clase C** incluye uno o dos motivos CpG dentro de una cadena de ODN con enlaces PO en el extremo 5' y una secuencia palindrómica con enlaces PS en el extremo 3'. De esta forma, combina propiedades estructurales y biológicas de los CpG-A y CpG-B. Por lo tanto, tienen la capacidad de estimular tanto la proliferación de linfocitos B como la producción de IFN-I por medio de pDCs (61-63).

Por último, el **CpG-ODN clase P** consiste en un ODN con enlaces PO y contiene dos motivos palindrómicos. Tiene gran capacidad en generar IFN-I y gran habilidad para activar el factor de transcripción nuclear NF- κ B para la producción de citoquinas inflamatorias (64).

Aunque los mecanismos de activación de los diferentes agonistas del receptor TLR9 no están absolutamente dilucidados, un elegante trabajo realizado por Kenya Honda y colab. explica la posible relación estructural de los distintos CpG-ODN con sus propiedades biológicas basándose en la regulación espaciotemporal de las distintas estructuras de CpG-ODN (65). Brevemente, dicho trabajo muestra que la activación de TLR9 puede desencadenar básicamente dos vías de señalización, la vía MyD88-IRF-7 para la inducción de IFN-I o la vía de señalización MyD88-NF- κ B para la producción de citoquinas proinflamatorias (65, 66). La capacidad del CpG-A de autoensamblarse y adoptar estructuras altamente ordenadas le permite ser retenido por largos periodos en los endosomas tempranos de las pDCs junto con el complejo MyD88-IRF-7 y de esta forma inducir la producción de IFN-I. En cambio, el CpG-B lineal, es rápidamente translocado a endosomas tardíos o lisosomas activando la vía de señalización NF- κ B para la producción de citoquinas proinflamatorias (65). Posteriormente, Guiducci y colab. apoyaron esta teoría y adicionalmente observaron mediante el uso de liposomas cargados con CpG-ODN capaces de liberar específicamente su cargo en respuesta a los distintos pH de los diferentes compartimentos subcelulares, que la interacción TLR9-

ligando en un compartimento de pH>6 (pH asociado a endosomas tempranos) era requerido para la producción de IFN- α mientras que la liberación del ligando en un entorno de pH<5,75 (pH asociado a lisosomas) podía apoyar la maduración de pDC pero no la producción de IFN-I (66). Adicionalmente, un trabajo de Okuya y colab. muestra que el conjugar el CpG-ODN con la chaperona proteína de shock térmico Hsp90 induce su retención en endosomas tempranos confirmando la capacidad de inducir IFN-I en DCs (67). Más recientemente, Sasai y colab. demostraron que la proteína cargo AP-3 que dirige la carga de proteínas desde endosomas hacia organelas relacionadas a lisosomas (lysosome-related organelles, LRO) es responsable del tráfico del receptor TLR9 a los compartimentos subcelulares para interactuar con IRF-7 y finalizar en la producción de IFN-I (68) de alguna forma contraponiéndose a la idea anterior de que los ligandos debían ser retenido en endosomas tempranos para lograr la producción de IFN-I (**Fig. 4**). Si bien, las vías de señalización que activan NF- κ B o IRF-7 aún no están del todo dilucidadas, se sabe con seguridad que son dos vías independientes y que existe una estrecha relación entre la localización del receptor TLR9 en los diferentes compartimentos subcelulares y su activación.

	Clase A (Tipo D)	Clase B (Tipo K)	Clase C	Clase P
Estructura ODN	Región fosfodiéster central conteniendo uno o más motivos CpG palindrómicos y extremos 5' y/o 3' conteniendo motivos poli (G) con esqueleto fosforotioato	Esqueleto con todos sus enlaces fosforotioato	Uno o más motivos CpG 5' y una región palindrómica 3'	Dos regiones palindrómicas con esqueleto fosforotioato
Ejemplos	ODN 2216 (para humano) ODN 2336 (para humano) ODN 1585 (para ratón)	ODN 2006 (también conocido como PF-3512676 y CpG 7909, para humano) ODN 1668 (para ratón) ODN 1826 (para ratón)	ODN 2395 (para ratón y humano) ODN M362 (para humano y ratón)	ODN 21798
Principales células estimuladas Acciones	pDCs Respuesta inmune innata: Secreción de IFN- α , TNF- α e IL-12 Respuesta inmune adaptativa: Secreción de IL-12 e IP10	Células B Respuesta inmune innata: secreción de IL-6, IL-10 e IL-12 Respuesta inmune Adaptativa: secreción de IL-6 e IL-12	pDCs y células B Respuesta intermedia entre clase A y B	pDCs Potente secreción de IFN- α en forma superior a la clase C

Tabla II. Clases de CpG-ODN y características inmunoestimulantes. Adaptado de Hanagata, 2012 (56)

Propiedades farmacológicas del CpG-ODN (PS)

Los fármacos aptámeros (ODNs de cadena sencilla de DNA o RNA diseñados para reconocer una gran variedad de moléculas) han sido aprobados por la agencia de Administración de Alimentos y Medicamentos (Food and Drug Administration, FDA) estableciendo una vía de regulación general para este tipo de drogas. Además, las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y eliminación (ADME) de los ODNs (PS) sintéticos, con o sin motivos CpG, ya han sido bien caracterizadas en la literatura (69). Incluso se ha demostrado que dichas características, son secuencia-independientes (70). Los ODN administrados por vía subcutánea (s.c.) se absorben en el sitio de inyección (con una mayor concentración localizada en LNs drenantes durante los primeros días post inyección), y luego entran en la circulación sistémica, donde demuestran una alta capacidad de unión a las proteínas plasmáticas, principalmente albúmina. Los ODNs son rápidamente dirigidos hacia los diferentes órganos, especialmente hígado, riñones y, en menor medida, bazo, pero no parecen cruzar la barrera hematoencefálica ni hematotesticular. El catabolismo de los ODNs típicamente ocurre mediante la digestión por exonucleasas endógenas que cortan la cadena de desde el extremo 3' resultando en la producción de bases naturales de DNA y metabolitos de tiofosfato que se excretan en la orina. Los efectos inmunoestimulatorios del CpG-ODN dependen de la vía de administración adoptada debido a su ADME como se describió previamente. Por ejemplo, la vía de administración s.c. se destaca por una rápida concentración de grandes cantidades de CpG-ODN en los LNs drenantes con consecuente inducción de altos niveles de citoquinas y quimoquinas. En cambio, la vía de administración intravenosa (i.v.) se caracteriza por una rápida dilución y bajo efecto inmunoestimulatorio (69).

Efectos adversos del CpG-ODN (PS) en modelos murinos y en humanos

Todas las clases de CpG-ODN (PS) descritas previamente contienen esqueletos con uno o más enlaces PS para ganar resistencia a la degradación enzimática pero estas modificaciones traen aparejadas ciertos efectos adversos. Por lo tanto, idealmente, se intenta desarrollar estrategias que logren aumentar la vida media del CpG-ODN (PO). Mientras tanto, hasta el momento, el CpG-ODN (PS) clase B es la familia de CpG-ODN

que se encuentra más avanzada en ensayos clínicos para uso humano y es por eso que decidimos usarlo para nuestro trabajo.

En general, como el receptor TLR9 se expresa en una gama más amplia de células inmunes en roedores en comparación con los primates, el roedor tiende a padecer una toxicidad mayor a la que se producirá en los primates. Presumiblemente, las toxicidades específicas de especie son una consecuencia del patrón celular de la expresión de TLR9 que determina las citoquinas que se producirán en respuesta a la administración de un CpG-ODN. Es por esta razón que existen tantas diferencias en los perfiles de seguridad reportados.

Las toxicidades descritas en relación a la administración de CpG-ODN (PS) en primates involucran problemas en activación del sistema de complemento, alteración de permeabilidad vascular (71) (72) y problemas de coagulación (73, 74). Hasta el momento, no se ha encontrado problemas en generación de autoinmunidad mediada por CpG-ODN en humanos, aunque si se ha reportado que puede agravar enfermedades autoinmunes en ratones como lupus, esclerosis múltiple y artritis (75-77). Contrariamente, en otros casos, se ha descrito que el CpG-ODN tiene la habilidad de proteger contra enfermedades autoinmunes e inflamatorias (78-81). Sin embargo, no nos centraremos en este tema porque si bien mencionamos algunos de los reportes de efectos adversos del CpG-ODN (PS), éstos están ligados a dosis sumamente altas administradas vía i.v. o a administraciones crónicas, las cuales no son aplicables al uso de adyuvantes y por lo tanto escapan de nuestro interés.

Aplicaciones terapéuticas del CpG-ODN

Gracias a sus particulares cualidades inmunoestimulantes, el CpG-ODN ha sido objeto de estudio para su aplicación en numerosas patologías. Aquí haremos una breve mención de algunas de sus aplicaciones.

- **Aplicación en enfermedades infecciosas**

El CpG-ODN induce una clara polarización de la respuesta inmunológica hacia un perfil Th1 (necesario para combatir infecciones intracelulares) y ha sido ampliamente utilizado para el tratamiento profiláctico en modelos murinos con resultados positivos contra infecciones virales, bacterianas y parasitarias,

incluyendo dosis letales de agentes bioterroristas de categoría A como *Bacillus anthracis*, *Vaccinia virus*, *Francisella tularensis* y Ébola (82). Con estos resultados, no se tardó en utilizarlo como adyuvante en vacunas contra agentes infecciosos. Particularmente el CpG-B ha sido ampliamente estudiado como adyuvante de vacunas para la inducción de una respuesta Th1 en modelos experimentales murinos dentro del contexto de diversas formulaciones. Entre ellas, podemos mencionar, antígenos proteicos o peptídicos, virus atenuados o inactivados, vacunas a DCs, y polisacáridos conjugados (40). En humanos, el CpG-ODN ha demostrado ser bien tolerado y ha sido utilizado en múltiples ensayos clínicos. Particularmente el CpG-B se ha descrito como un adyuvante muy eficiente en vacunas contra hepatitis B, cuando se utiliza tanto solo (83, 84) como combinado con sales de aluminio (85, 86) con alta protección por medio de anticuerpos.

- **Aplicación en alergias**

La respuesta perfil Th1 que induce el CpG-ODN es tan fuerte que no sólo puede polarizar la respuesta inmune hacia un perfil celular Th1 sino que, en numerosas ocasiones, puede incluso revertir una respuesta perfil Th2 asociada a alergias. En modelos murinos de alergia, el CpG-ODN ha logrado redirigir la respuesta alérgica Th2 y prevenir manifestaciones inflamatorias inclusive en animales en donde la patología ya estaba instalada (87). En humanos, el CpG-B tuvo buenos resultados en fases iniciales de ensayos clínicos para el tratamiento contra rinitis alérgica (88, 89). La gran limitación en el desarrollo de una vacuna para alergias recae en el concepto de que la mayoría de las personas son alérgicas a una gran variedad de antígenos y es muy difícil generar un tratamiento profiláctico de cobertura completa.

- **Aplicación en cáncer**

Una respuesta antitumoral requiere de la activación de una respuesta inmune innata y adaptativa del tipo celular y es ampliamente favorecida por un perfil de respuesta Th1. El CpG-ODN es capaz de activar multitud de células involucradas en la respuesta antitumoral como células NK, macrófagos, linfocitos T CD4+ (perfil Th1) y, en ciertos casos, T CD8+ citotóxicos. Diferentes clases de CpG-ODN se encuentran hoy en día en avanzados ensayos clínicos en el desarrollo de

vacunas terapéuticas contra diversos tipos de cáncer como melanoma, linfoma no Hodgkin, glioblastomas y cáncer de mama (90). Estudios en el tratamiento contra melanoma en humanos han reportado resultados favorables en el uso de CpG-ODN como adyuvante con aumentos significativos en la respuesta celular T CD8+ citotóxica específica del tumor (91). Otros estudios sugieren la necesidad de terapias combinadas con anticuerpos, radiación o quimioterapia para casos donde el tumor se encuentra en estadios avanzados. Ensayos clínicos que utilizan CpG-ODN para el tratamiento de melanoma y cáncer de pulmón de células pequeñas han sugerido que la combinación del CpG-ODN con quimioterapia induce una potente respuesta antitumoral que se correlaciona con beneficios clínicos (92, 93).

En las siguientes tablas se muestran el estado en ensayos clínicos del CpG-ODN como adyuvante para enfermedades infecciosas (**Tabla III**) y cáncer (**Tabla IV**). Si bien, hasta el momento, ninguna clase de CpG-ODN ha sido licenciada para uso humano, es uno de los adyuvantes más prometedores y se encuentra integrando numerosas formulaciones en estadios avanzados de ensayos clínicos.

Número de ensayo clínico	Enfermedad infecciosa	Tratamiento	Vía	Fase
NCT00344539	Malaria	AMA1-C1/Alhydrogel® (20, 80 µg) ± CpG 7909 (564 µg)	i.m.	I
NCT00414336	Malaria	AMA1-C1/Alhydrogel® (80 µg) ± CpG 7909 (564 µg)	i.m.	I
NCT00320658	Malaria	AMA1-C1/Alhydrogel® (20, 80 µg) + MSP1 ₄₂ - C1/Alhydrogel® (80 µg) ± CpG 7909 (564 µg)	i.m.	I
NCT00984763	Malaria	AMA1-C1/Alhydrogel® (80 µg) ± CpG 7909 (564 µg)	i.m.	I/IIa
NCT00889616	Malaria	BSAM2/Alhydrogel®(40, 160 µg) + CPG 7909 (564 µg)	i.m.	I
NA	Influenza	Fluarix® (0.5, 0.05 mL) ± CpG 7909 (1 mg)	i.m.	Ib
NCT00562939	Neumococo en adultos infectados con HIV	PCV7 (Prevnar®), PPV-23 (PneumoNovum®) (1 mL) ± CPG 7909 (1 mg)	i.m.	Ib/IIa
NCT00722839	Citomegalovirus (CMV)	PADRE-CMV (1.5, 2.5, 10 mg), péptido fusión tétano-CMV ±CpG 7909 (1 mg)	s.c.	Ib
NA	HBV	HBsAg (20 µg) + 1018 ISS (300, 650, 1000, 3000 µg)	i.m.	I
NA	HBV	rHBsAg (20 µg) + 1018 ISS (3 mg), Engerix-B®	i.m.	II
NA	HBV	rHBsAg (20 µg) + 1018 ISS (3 mg), Engerix-B® (1 mL)	i.m.	III
NA	HBV	rHBsAg (20 µg) + 1018 ISS (3 mg),	i.m.	III
NA	HBV en adultos de 40–70 años	rHBsAg (20 µg) + 1018 ISS (3 mg), Engerix-B® (1 mL)	i.m.	III
NA	HBV	Engerix-B® (20 µg HBsAg) ± CpG 7909 (0.125, 0.5, 1 mg)	i.m.	I/II
NA	HBV en adultos infectados con HIV	Engerix-B® (40 µg HBsAg) + CpG 7909 (0.5, 1 mg)	i.m.	Ib/IIa
NA	Ántrax	Bio-Thrax® (0.5 mL), ±CpG 7909 (1 mg)	i.m.	I
NCT01263691	Ántrax	Bio-Thrax® (0.5 mL), AV7909: AVA (0.25–0.5 mL) + CpG 7909 (0.25–0.5 mg)	i.m.	I

Tabla III: Ensayos clínicos utilizando CpG-ODN como adyuvantes de vacunas contra enfermedades infecciosas. Adaptado de Scheierman, 2014 (94)

Número de ensayo clínico	Tipo de cáncer	Tratamiento	Vía	Fase
NA	Melanoma	2/Melan-A (100 µg) Montanide®ISA-51 (300 µg), + CpG 7909 (500 µg)	s.c.	I
NCT00085189	Melanoma grado III–IV	NY-ESO-1 (600 µg), Montanide®ISA-51 (3 mL), ±CpG 7909 (2 mg)	s.c.	II
NCT00306514 , 00306566, 00306553	Melanoma grado II–IV	CYT004-MelQbG10 (1 mg)	s.c/i.d	I/II
NCT00651703	Melanoma grado III–IV	CYT004-MelQbG10, Montanide® ISA-51, Imiquimod 5%,	s.c./i.d./i.n.	IIa
NCT00112229	Melanoma grado III–IV	Melan-A/Mart-1, Tyrosidase (YMD) Montanide® ISA-51 ± CpG 7909	s.c.	I
NA	Melanoma grado III–IV	MART-1, gp100, tytosinase peptides, Montanide® ISA-51, + CpG 7909 (600 µg), GM-CSF (80 µg)	s.c.	I
NA	Múltiples clases (melanoma, cáncer de mama, cáncer de ovario sarcoma) grados I–IV	rNY-ESO-1 (100, 400 µg), Montanide® ISA-51, + CpG 7909 (2.5 mg),	s.c.	NA
NCT00199836	Múltiples clases (melanoma, NSCLC, cáncer de mama, cáncer de ovario, sarcoma) grado III–IV	NY-ESO-1b (100 µg), Montanide®ISA-51 (0.5 mL), +CpG 7909 (1 mg)	s.c.	I
UMIN 000002771	Múltiples clases (cancer de colon, páncreas, recto, pulmón, epiteloide, de papila)	WT-1, GM-CSF (100 µg), Montanide® ISA-51, ±CpG7909 (100 µg)	i.d.	I
NCT00669292	Cáncer esofágico	URLC10-117 peptide (1 mg), TTK-567 peptide (1 mg), Montanide® ISA-51, + CpG 7909 (0.02, 0.1 mg/kg)	s.c.	I/II
NCT00299728	Cáncer de próstata	NY-ESO-1 (100 µg), +CpG 7909 (2,5 mg)	i.d.	I

Tabla IV: Ensayos clínicos utilizando CpG-ODN como adyuvantes de vacunas contra diferentes clases de cáncer. Adaptado de Scheierman, 2014 (94)

Desventajas del CpG-ODN

A pesar del enorme potencial del CpG-ODN como adyuvante, existen numerosas desventajas en relación a su estructura química (54, 69, 95, 96):

- **Vida media corta:** una vez en el organismo es rápidamente degradado por nucleasas endógenas y es rápidamente absorbido desde el sitio de administración hacia la circulación sistémica reduciendo su actividad biológica. Este problema es parcialmente resuelto por el reemplazo de enlaces PO por PS lo cual aumenta su vida media desde 5-10 minutos hasta 30-60 minutos en plasma.
- **Internalización celular baja e inespecífica:** su carga negativa se repele con la carga negativa de las membranas celulares haciendo de su internalización celular un proceso poco eficiente. Además, el CpG-ODN entra a las células vía endocitosis independientemente de si la célula expresa o no el receptor TLR9, creando un efecto dilutivo.
- **Unión a proteínas plasmáticas:** Se trata de un polianión con alta capacidad de unión a proteínas plasmáticas, principalmente albúmina, lo que disminuye su disponibilidad.
- **Farmacocinética y biodistribución no favorables (mencionadas previamente):** Tras inmunización vía i.v. o s.c., es rápidamente distribuido en hígado y riñones y en menor medida en bazo y médula ósea. A pesar de que dichos estudios se realizaron en primates no humanos, se asume que la farmacocinética en humanos y otras especies es similar.

La mayoría de estas desventajas están asociadas a los enlaces PS y son secuencia independiente. Con el objetivo de resolver estos problemas, numerosos grupos de investigación han trabajado en el desarrollo de nuevas estrategias de formulación para el CpG-ODN. Sin embargo, muchas de estas estrategias tienen ciertas dificultades principalmente en relación a problemas de toxicidad, estabilidad, biocompatibilidad, costo y complejidad en su proceso de producción (52, 96-98).

En este trabajo de tesis, proponemos una innovadora estrategia para la formulación del CpG-ODN que involucra el uso de una nanoestructura a la que denominaremos a lo largo del trabajo como coagel (Coa-ASC16). Utilizaremos como antígeno modelo a la proteína ovoalbúmina (OVA). La formulación de la OVA junto con el CpG-ODN en la nanoestructura de coagel será referida a lo largo del trabajo como

OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. La presente tesis fue desarrollada en el marco de un trabajo interdisciplinario formado por un grupo de investigadores farmacéuticos liderados por los doctores Daniel Allemandi y Santiago Palma (UNITEFA, FCQ, UNC) e inmunólogos liderados por la Dra. Belkys Maletto (CIBICI-CONICET, FCQ, UNC).

Nanoestructura formada por autoensamblaje de palmitato de ascorbilo en fase coagel: Coa-ASC16

El Coa-ASC16 consiste en una nanoestructura formada por autoensamblaje del éster de palmitato de 6-O-ascorbilo (ASC16). El ASC16 combina en su estructura un grupo lipofílico y un grupo hidrofílico y es una molécula insoluble en medio acuoso a temperatura ambiente. Se obtiene a través de la esterificación del grupo hidroxilo en la posición 6 del ácido ascórbico (grupo hidrofílico) o vitamina C, con ácido palmítico (ácido graso de 16 carbonos) hidrofóbico y, como toda sustancia anfifílica, presenta propiedades tensioactivas. Cuando el ASC16 se calienta en un medio acuoso comienza a agregarse a la temperatura micelar crítica (critical micelle temperature, CMT) en la que la solubilidad alcanza la concentración micelar crítica (critical micelle concentration, CMC). Por encima de esta temperatura, el ASC16 forma una fase gel caracterizada por la formación de dispersiones transparentes. Al enfriarse, en lugar de formarse un precipitado, se forma una nanoestructura de cristal líquido denominada Coa-ASC16 de características opacas, color blancuzco y consistencia más viscosa que el gel (99) (**Fig. 7**).

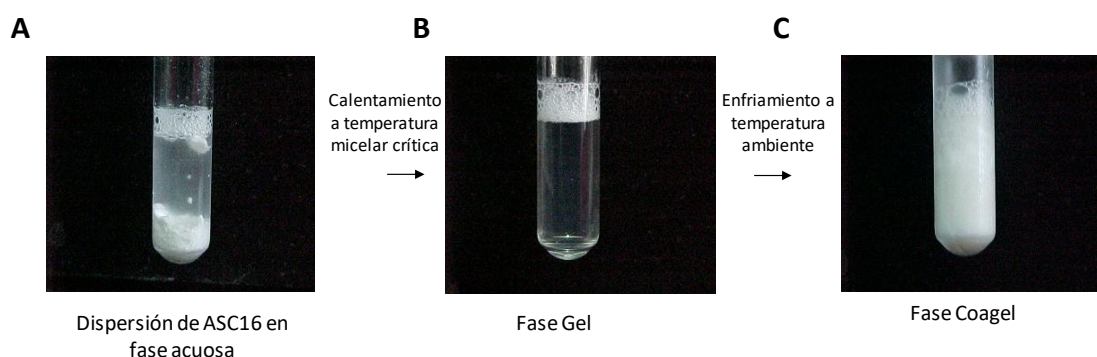


Figura 7. Fotografías obtenidas para observar macroscópicamente los distintos pasos de formación del coagel.

El coagel puede definirse como una mesofase semicristalina o un cristal pobremente hidratado con una estructura lamelar donde las cadenas hidrocarbonadas del ácido palmítico se encuentran separadas por capas intermedias de moléculas de agua en una distancia no mayor a 10 Å. En esta estructura, como se muestra en la **Fig. 8**, las cadenas de ácido palmítico se disponen paralelamente unas con otras formando láminas cuyos extremos se componen de las cabezas polares correspondientes al ácido ascórbico que están en contacto con el agua. Esta estructura impone al menos una dimensión altamente ordenada que exhibe un claro patrón de difracción de rayos X y birrefringencia óptica (100). Se ha reportado previamente, un diagrama de fases completo en agua que describe cómo interactúan las moléculas de agua con el ASC16 en la estructura bilamelar (101). Adicionalmente, estudios posteriores sugieren que, en la formulación completa OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16, ambas moléculas hidrofílicas (OVA y CpG-ODN) se sitúan en el dominio interlamelar acuoso (102).

En este proyecto, trabajamos con la fase coagel, de consistencia semisólida y estable a temperatura ambiente, cuyas propiedades reológicas permiten fácilmente su carga en una jeringa para ser administrada en forma s.c.

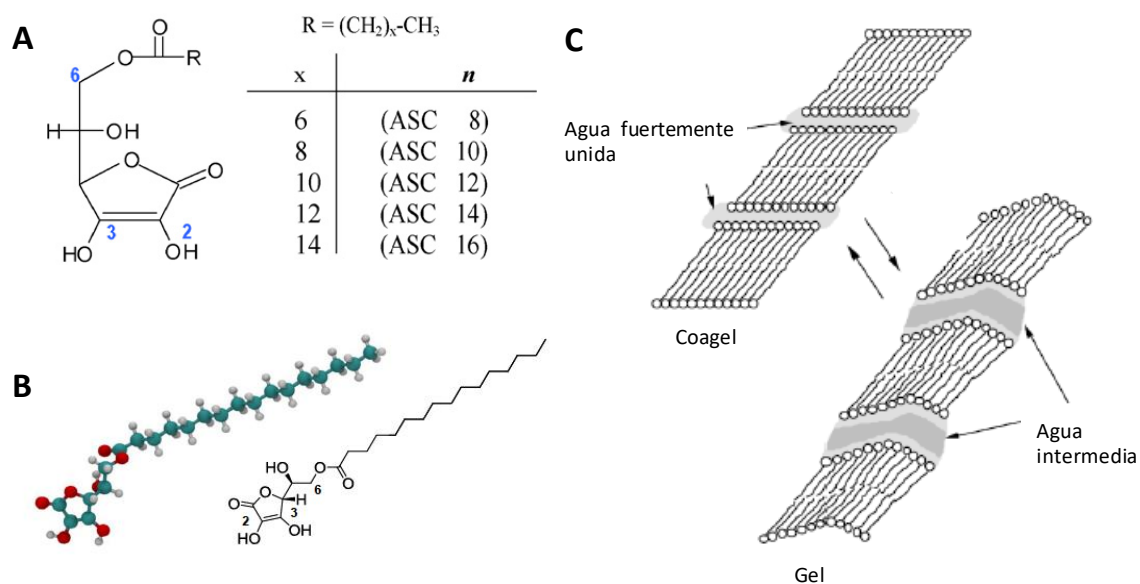


Figura 8. (A) Esquema de la estructura química de ASCn. (B) Estructura química de ASC16. Las esferas blancas, celestes y rojas corresponden a los átomos de hidrógeno, carbono y oxígeno respectivamente. **(C) Esquema de la fase coagel en equilibrio con la fase gel para ASCn con n >12.** Los esquemas A y C son adaptaciones de Palma, 2007 (103).

Ventajas del Coa-ASC16

Coa-ASC16 tiene las siguientes ventajas que lo convierten en una plataforma muy atractiva para uso biomédico: (i) está compuesto por una sola molécula de un éster formado por ácido ascórbico y ácido palmítico, que son moléculas biodegradables; (ii) el ácido ascórbico conserva su propiedad antioxidante; (iii) el ASC16 figura como sustancia generalmente reconocida como segura (generally recognized as safe, GRAS) por la FDA para uso humano en formulaciones farmacéuticas de administración oral o alimentos (104); (iv) su producción a gran escala es factible por su bajo costo y fácil manufactura cumpliendo con las buenas prácticas de producción (105); (v) sus propiedades fisicoquímicas le permiten formular sustancias de diferente naturaleza (anfifílicas, hidrofílicas o hidrofóbicas) (103, 106); (vi) es bien tolerado fisiológicamente en modelos animales (107, 108).

Formulación a utilizar en el presente trabajo de tesis

El presente trabajo de tesis es una continuación del estudio realizado sobre la capacidad inmunoestimulante del CpG-ODN formulado en el Coa-ASC16 utilizando a la proteína OVA como antígeno con el objetivo de optimizar su actividad biológica. En él, profundizaremos sobre la capacidad de esta formulación de potenciar tanto en calidad como en cantidad la respuesta humoral con dos estrategias de inmunización diferentes (Capítulo I). Posteriormente focalizaremos nuestro trabajo en el estudio de la respuesta celular T CD8+ citotóxica efectora (Capítulo II) y de memoria (Capítulo III) inducida por esta formulación y profundizaremos sobre algunos mecanismos moleculares propuestos en la participación de dicha respuesta.

ANTECEDENTES DEL GRUPO

En trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se ha analizado la actividad adyuvante de la formulación propuesta, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en la respuesta inmune humoral y celular Th1 utilizando principalmente un esquema de tres inmunizaciones en animales BALB/c. Asimismo, se evaluó la seguridad de este sistema mediante análisis histológicos y toxicológicos (108).

Brevemente, ensayos in vivo han demostrado que la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16:

1. Induce una respuesta inmune antígeno específica (humoral y celular) superior a la generada en ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN y que esa respuesta se mantiene en el tiempo por al menos 6,5 meses (memoria).
2. Induce una respuesta inmune específica superior en comparación a la respuesta inmune inducida por formulación del CpG-ODN con el adyuvante licenciado para uso humano, aluminio (en forma de sales de aluminio).
3. Es bien tolerada fisiológicamente indicando una baja toxicidad sistémica. Dichos resultados fueron valorados mediante diferentes parámetros como análisis de transaminasas, creatinina y estudios histológicos de diferentes órganos (hígado, riñón, bazo y pulmón).

Ensayos in vitro han demostrado que:

4. El Coa-ASC16 genera una liberación controlada de CpG-ODN y OVA (posible mecanismo de su acción “enhancer”).
5. El Coa-ASC16 tiene un efecto protector sobre la digestión por 3' exonucleasas sobre CpG-ODN (PO).

Por otro lado, se ha evaluado el efecto inflamatorio que posee el Coa-ASC16 “per se” sobre el sistema inmune, su importancia en el efecto adyuvante y capacidad como sistema “depot” sobre el antígeno en el sitio de inyección (109).

Se ha comprobado in vivo que el Coa-ASC16:

1. Es censado por el sistema inmune generando una respuesta inflamatoria per se y que esa respuesta depende de la proteína adaptadora MyD88 y es independiente del inflamasoma NLRP3.
2. Genera la liberación local de DNA de doble cadena que actúa como DAMP, reclutamiento celular de neutrófilos y monocitos Ly6C^{high} y producción de citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-12 e IL-1 β). Además, la generación de citoquinas IL-6 e IL-12 inducida por el Coa-ASC16, a diferencia del reclutamiento celular, es dependiente de TLR9.
3. Formulado sólo con OVA (OVA/Coa-ASC16) tiene un efecto “depot” sobre la misma, liberándola en forma lenta y sostenida en el tiempo desde el sitio de administración.

HIPÓTESIS

En estudios obtenidos previamente por este grupo se ha demostrado que la formulación del CpG-ODN con el Coa-ASC16 potencia la actividad adyuvante del CpG-ODN sobre la respuesta humoral y celular asociada a un perfil Th1 y que el Coa-ASC16 tiene un efecto “per se” sobre la respuesta innata (108, 109). En base a estos resultados, hipotetizamos que el Coa-ASC16 es capaz de inducir adicionalmente una respuesta celular del tipo T CD8+ citotóxica tanto efectora como de memoria superior a la inducida por el OVA/CpG-ODN en solución. Además, especulamos que posiblemente la combinación del CpG-ODN con el Coa-ASC16 esté promoviendo la producción de citoquinas altamente involucradas en la polarización hacia un perfil celular Th1 y T CD8+ citotóxico como IFN-I, siendo una de las razones por las cuáles se genera esta respuesta celular T. Adicionalmente, hipotetizamos que el incremento en la magnitud de la respuesta humoral está relacionado con la elevada producción de IL-6 observada localmente en respuesta al Coa-ASC16 (109) y que esta formulación, tiene, por lo tanto, un efecto positivo sobre la calidad de la respuesta humoral generada.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto adyuvante del CpG-ODN formulado en el sistema nanoestructurado Coa-ASC16

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Caracterizar la respuesta inmune humoral generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16*
- 2. Caracterizar la respuesta inmune celular de tipo T CD8+ EFECTORA generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16*
- 3. Caracterizar la respuesta inmune celular de tipo T CD8+ de MEMORIA generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16*

RESULTADOS

CAPÍTULO I

*Efecto adyuvante sobre la respuesta humoral
del CpG-ODN formulado en un sistema
nanoestructurado*

A pesar de décadas de estudio en el desarrollo de vacunas, hasta el momento, la gran mayoría de las vacunas tradicionales licenciadas para uso humano están fabricadas en base a organismos enteros y ejercen su protección a expensas de la generación de anticuerpos que contienen al patógeno o neutralizan sus toxinas (6, 110). Este tipo de inmunidad puede ser inducida por una gran variedad de plataformas vacunales que incluyen vacunas a organismos vivos atenuados o inactivados, proteínas recombinantes, toxoides o conjugados proteína-polisacáridos. La respuesta humoral generada por muchas de estas vacunas es de larga vida (memoria) y no requiere de refuerzos para generar una protección sostenida (111). Sin embargo, existe un grupo sustancial de individuos para los cuáles dichas vacunas, incluso las que utilizan el conocido adyuvante aluminio, no logran alcanzar una tasa de seroconversión adecuada (detección de anticuerpos específicos de antígeno en suero previamente indetectables) o títulos de anticuerpos suficientes para generar protección (6). Además, en general, la protección generada por las vacunas actuales se ve reducida en individuos que padecen de ciertas patologías renales crónicas y tiende a debilitarse con la edad en adultos sanos a partir de los 40-50 años (112). El agregado de nuevos adyuvantes a vacunas ya existentes, ha sido empleado como estrategia para ciertas enfermedades como influenza (113) y hepatitis B (83) resultando en beneficios significativos para individuos de edad avanzada. La capacidad de una vacuna para generar protección humoral es de vital importancia, pero queda claro que aún quedan problemas por resolver, y que el diseño racional de nuevas estrategias adyuvantes es necesario para solventar las falencias actuales.

Es este trabajo, planteamos una estrategia utilizando un adyuvante que ha sido ampliamente descrito en la literatura, el CpG-ODN, como componente de una nueva formulación adyuvante. El efecto estimulante directo del CpG-ODN sobre las células B ha sido ampliamente descrito en numerosos trabajos (98). La activación simultánea del receptor TLR9 y el BCR induce la estimulación directa de linfocitos B específicos de antígeno (39). Dicho estímulo desata diversos eventos como inhibición de apoptosis (114) y promoción del cambio de isotipo IgG específico de antígeno preferentemente hacia un perfil Th1 (IgG2c) asociado a una respuesta inmune contra patógenos intracelulares (47, 115-118). En ciertos modelos experimentales donde se ha utilizado

al CpG-ODN como adyuvante vacunal, se ha descrito también que este ligando TLR9 es capaz de incrementar la proporción de anticuerpos de alta avidéz, sugiriendo un efecto positivo en el proceso de hipermutación somática de células B activadas (119), acelerar el proceso de seroconversión (120) e incluso permitir la reducción de la dosis de antígeno utilizada sin afectar el nivel de protección generado (121).

Adicionalmente, se ha observado en modelos murinos que el CpG-ODN es capaz de inducir una respuesta humoral perfil Th1 en ratones de edad avanzada que presentan un sistema inmune predispuesto hacia un perfil Th2 (122, 123).

A pesar de su enorme potencial, el CpG-ODN, como ya mencionamos, presenta ciertas dificultades relacionadas mayormente a su corta vida media y a su farmacocinética y biodistribución poco favorable para la activación del sistema inmune. Con el objetivo de sobrepasar estas dificultades se han desarrollado innumerables estrategias para optimizar su actividad adyuvante y aprovechar al máximo sus cualidades inmunoestimulantes (52, 96-98). Sin embargo, la mayoría de las estrategias adyuvantes son costosas, complejas o presentan problemas de toxicidad por lo que dificultosamente pueden llegar a su producción a gran escala para uso humano (96). Aquí presentamos una nueva estrategia para la formulación del CpG-ODN que es simple, de bajo costo y bien tolerada fisiológicamente resultando prometedora para su uso en futuras vacunas.

En este primer capítulo, analizaremos el efecto potenciador del coagel utilizado como plataforma para la formulación del CpG-ODN sobre la respuesta humoral en magnitud (nivel de título de anticuerpos alcanzados), calidad (avidéz de los anticuerpos generados) y perfil de respuesta (isotipos de anticuerpos asociados a respuestas Th1 y Th2) utilizando dos esquemas de inmunización diferentes. Adicionalmente, nos proponemos indagar sobre algunos de los posibles mecanismos involucrados en dicho efecto.

RESULTADOS DEL CAPÍTULO I

Estudio de la capacidad de potenciación de la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 bajo un esquema de tres inmunizaciones

Nuestro grupo ha demostrado previamente que la formulación del adyuvante CpG-ODN en el coagel incrementa significativamente su capacidad en la generación de anticuerpos específicos de antígeno asociados a ambos perfiles inmunológicos Th1 (isotipo IgG2a en cepa BALB/c o IgG2c en cepa C57BL/6) y Th2 (isotipo IgG1) utilizando un esquema de tres inmunizaciones en ratones BALB/c (108).

Por motivos técnicos, para lograr ampliar las herramientas de estudio sobre este sistema, se tomó la decisión de cambiar de cepa de estudio de BALB/c a C57BL/6. Dado que dichas cepas presentan ciertas diferencias en sus predisposiciones genéticas respecto a su sistema inmunológico, creímos adecuado controlar que dicha respuesta humoral observada en el trabajo previo se repitiera en la nueva cepa de trabajo.

Con este objetivo, se inmunizaron ratones C57BL/6 vía s.c. mediante un esquema de tres inmunizaciones separadas una de otra por un periodo de una semana. Dicho protocolo fue utilizado en la mayor parte de los trabajos previos publicados por este grupo. Para ello, los animales fueron inmunizados en los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16. Al día 21, se obtuvo el plasma de los animales con el fin de evaluar los títulos de inmunoglobulinas específicas de antígeno. Los resultados demuestran que la formulación del CpG-ODN en el Coa-ASC16 potencia sustancialmente la respuesta humoral induciendo títulos de IgG total OVA-específicos alrededor de 2 veces superior en magnitud que su contraparte soluble OVA/CpG-ODN y que la formulación en ausencia del CpG-ODN (OVA/Coa-ASC16) (**Fig. 1.1 A**). Adicionalmente, la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 indujo un incremento significativo en los subtipos de anticuerpos IgG1 e IgG2c asociados a ambos perfiles de respuesta Th2 y Th1 respectivamente en comparación a las demás formulaciones utilizadas (**Fig. 1.1 B**). Como se puede observar, el comportamiento de los títulos de IgG1 es similar al de IgG total para todas formulaciones mientras que no es así para el subtipo IgG2c. Cabe destacar que, en animales C57BL/6, la inmunización con OVA/CpG-ODN no logra generar anticuerpos detectables de perfil Th1 y que el incremento en la magnitud de los títulos de IgG2c inducido por la formulación con Coa-

ASC16 es absolutamente dependiente del CpG-ODN. Estos datos sugieren que la formulación del CpG-ODN en el Coa-ASC16 potencia el efecto adyuvante innato del CpG-ODN asociado a la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1.

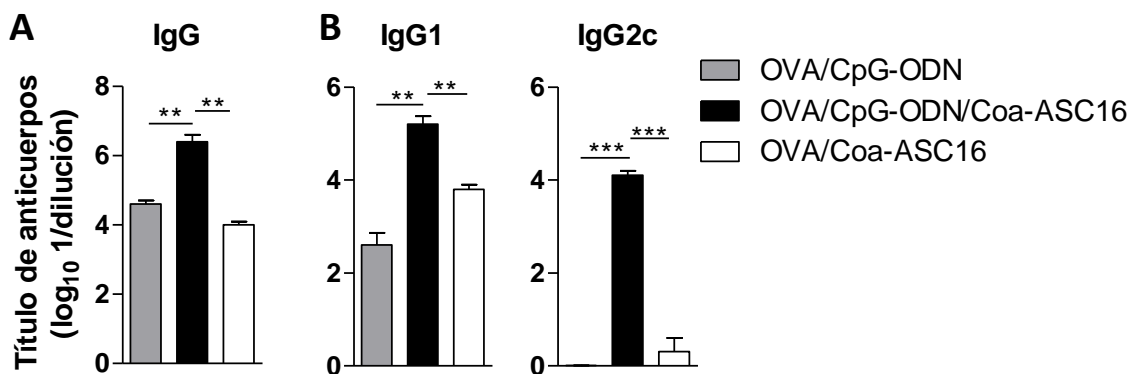


Figura 1.1. Potenciación de la respuesta humoral por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 fueron inmunizados en los días 0, 7 y 14 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16. Al día 21 post primera inmunización, se recolectó el plasma para la medición de anticuerpos específicos para OVA por ELISA. **(A)** Títulos de IgG total y **(B)** subtipos IgG1 e IgG2c. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones por grupo de tratamiento) y son representativos de dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Evaluación de la calidad (avidez) de la respuesta inmune humoral inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

Adicionalmente, evaluamos la calidad de los anticuerpos generados mediante la medida de su avidez. Para ello, se comparó la avidez de los anticuerpos generados tras inmunización con OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14 con aquellos obtenidos por inmunización con OVA emulsionada en el adyuvante completo de Freud (CFA) en los días 0, 15 y 30. Siete días después de la última inmunización, los animales fueron sangrados para la obtención de plasma y la medición de avidez de los anticuerpos IgG OVA-específicos mediante un ELISA de avidez utilizando como agente caotrópico al tiosianato de potasio (KSCN). El mismo, perturba los puentes de hidrógeno que mantienen estables los complejos antígeno-anticuerpo. De esta forma, mediante el sometimiento de los diferentes complejos antígeno-anticuerpo a concentraciones crecientes de KSCN es posible evaluar la fuerza con las que se mantienen unidos dichos complejos. Como resultado, pudimos observar que la avidez de los anticuerpos de ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es muy

superior a la de los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN y comparables a los de ratones inmunizados con OVA/CFA (**Fig. 1.2**).

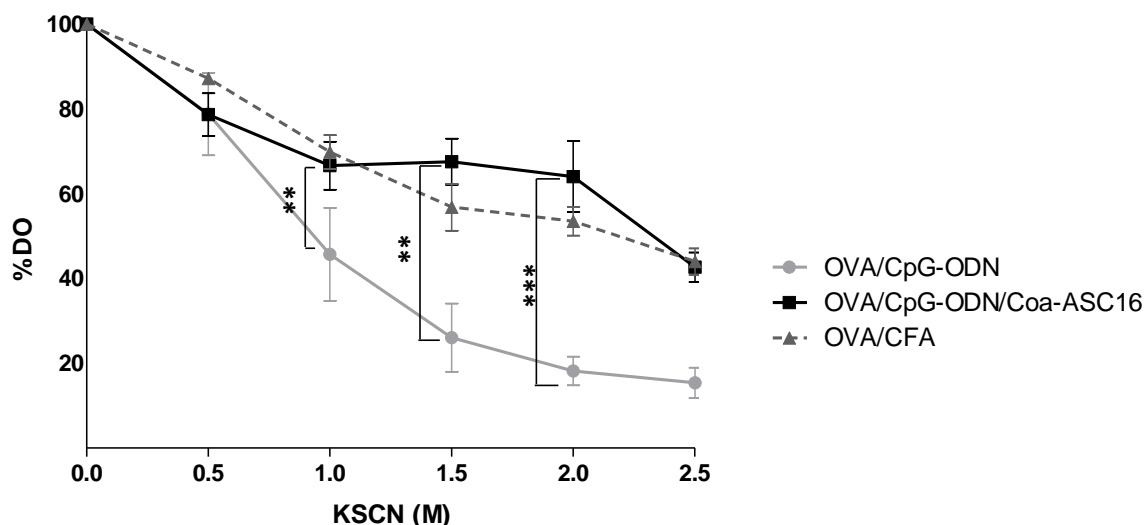


Figura 1.2. Incremento en la calidad de la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14 o con OVA/CFA en los días 0,15 y 30. Siete días después de la última inmunización, se determinó la avididad de IgG específica de OVA en plasma mediante ELISA usando el ensayo de titulación de KSCN. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones por grupo de tratamiento) y son representativos de dos experimentos independientes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Evaluación de la participación de la IL-6 en la potenciación de la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

La IL-6 es una citoquina pleiotrópica ampliamente involucrada en la generación de anticuerpos de mayor especificidad (avididad). Su efecto sobre la respuesta humoral está dado por su participación en el desarrollo de CGs dentro de los LNs donde se producen los fenómenos de cambio de isotipo, hipermutación somática y desarrollo de células B de memoria (124-128). Dado que previamente hemos reportado que el coagel es censado por el sistema inmune innato con la consiguiente producción local de, entre otras citoquinas, altos niveles de IL-6 (109), nos preguntamos si había alguna relación entre la producción de IL-6 inducida por el coagel y la respuesta humoral generada por la formulación. Para ello, se inmunizaron ratones deficientes para la interleuquina IL-6 (*Il-6^{-/-}*) con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. Al día 21

post inmunización se obtuvo el plasma de estos animales para el análisis de anticuerpos específicos de antígeno. Sorprendentemente, el efecto potenciador inducido por la plataforma Coa-ASC16 sobre la magnitud de la respuesta humoral es independiente de la vía de señalización mediada por IL-6 (**Fig. 1.3**).

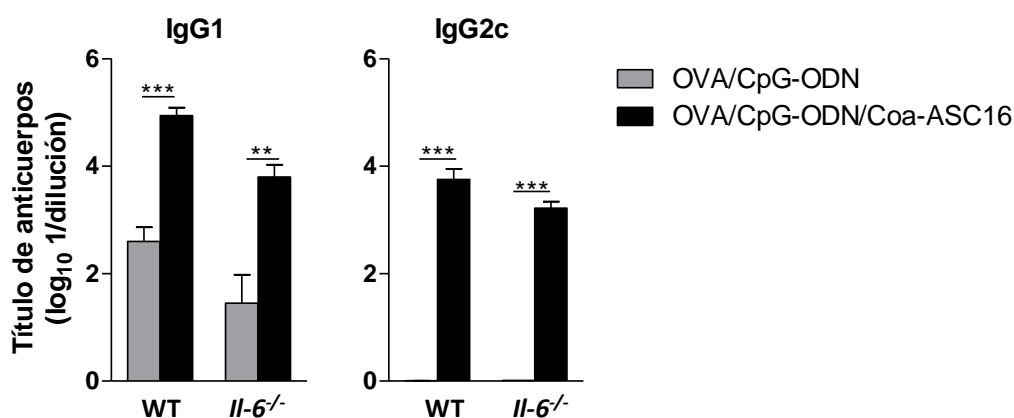


Figura 1.3. Estudio de la participación de la vía de señalización mediada por IL-6 sobre la respuesta humoral inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales WT o IL-6^{-/-} fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 a los días 0, 7 y 14. Al día 21 post primera inmunización, los animales fueron sangrados para la obtención de plasma y posterior análisis de los títulos de IgG1 e IgG2c específicos de OVA. Los datos representan la media ± SEM de valores individuales (3-4 ratones por grupo de tratamiento) y son representativos de dos experimentos independientes. **p<0,01; ***p<0,001.

Análisis de la capacidad de la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 para reducir la dosis de antígeno sin afectar la respuesta inmune generada

Además del efecto potenciador del coagel tanto en la respuesta celular Th1 como en la respuesta humoral, nos preguntamos si el uso de esta plataforma podría permitir la reducción de la dosis de antígeno sin alterar significativamente los resultados observados previamente. Con este objetivo, se inmunizaron ratones C57BL/6 a los días 0, 7 y 14 con OVA (2 µg)/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA (6 µg)/CpG-ODN/Coa-ASC16. Notablemente, tanto los títulos de los diferentes subtipos de anticuerpos específicos de antígeno, IgG1 e IgG2c (**Fig. 1.4 A**), como la respuesta celular Th1 evaluada por medio de la secreción ex vivo de IFN-γ en cultivos de esplenocitos provenientes de ratones inmunizados, no mostraron diferencias significativas (**Fig. 1.4**

B). Dicho resultado demuestra el potencial del uso de esta plataforma nanoestructurada para utilizar pequeñas dosis de antígenos proteicos sin alterar su efectividad como adyuvante.

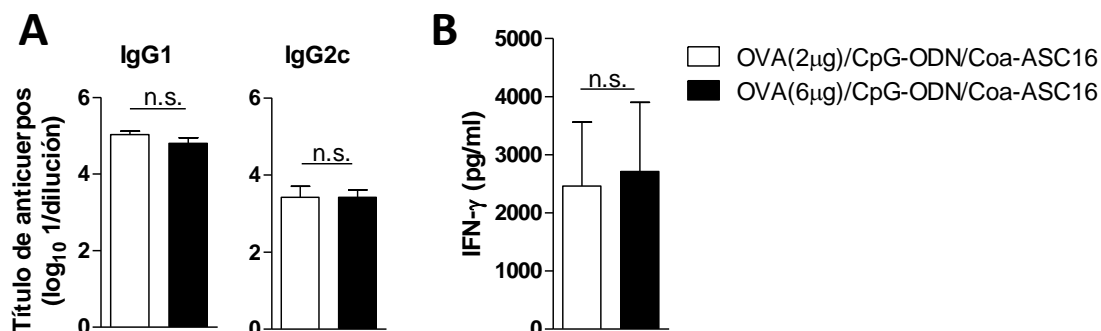


Figura 1.4. Capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para reducir la dosis de antígeno sin afectar la actividad adyuvante. Animales C57BL/6 fueron inmunizados a los días 0, 7 y 14 con OVA (2μg)/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA(6μg)/CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 21 post primera inmunización, los animales fueron sacrificados para obtención de plasma y bazo. **(A)** Títulos de anticuerpos IgG1 e IgG2c específicos de OVA. **(B)** Secreción ex vivo de IFN-γ en cultivos de células de bazo tras reestimulación con OVA. Los datos representan la media ± SEM de valores individuales (3-4 ratones por grupo de tratamiento) y son representativos de dos experimentos independientes. ns: no significativo.

Evaluación de la respuesta humoral inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 al reducir el número de inmunizaciones a una sola dosis

En el área de vacunas, es necesario considerar que el requerimiento de la utilización de dosis de refuerzo puede convertirse en un problema real en términos de practicidad y costos. Por lo tanto, el objetivo final de este capítulo es examinar el efecto adyuvante de esta innovadora estrategia reduciendo el número de inmunizaciones de tres a una sola aplicación.

Para ello, se realizó una cinética en sangre de anticuerpos IgG específicos de antígeno en ratones inmunizados en el día 0 con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 durante un periodo de 140 días (aproximadamente 5 meses). Los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron seroconversión en los primeros días (alrededor del día 10) mientras que los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN no lograron generar títulos positivos de IgG con una sola inmunización. Además, es los niveles de anticuerpos IgG inducidos por inmunización con OVA/CpG-

ODN/Coa-ASC16 llegan a un pico alrededor del día 20 post inmunización y se mantienen estables a lo largo del tiempo por un periodo de 5 meses demostrando la generación de memoria humoral (**Fig. 1.5 A**). Los niveles de IgG2c detectados en dichos animales al día 140 post inmunización indican que el perfil de respuesta asociado a Th1 también se mantiene en la fase memoria (**Fig. 1.5 B, día 140**). Con el objetivo de simular un segundo encuentro con el antígeno, se realizó un desafío mediante inyección intraperitoneal con OVA al día 147 post inmunización y se midieron en sangre los títulos de anticuerpos IgG total (**Fig. 1.5 A**), y el subtipo IgG2c pre y post desafío (**Fig. 1.5 B**). Este segundo encuentro con el antígeno no mostró ningún efecto significativo sobre la respuesta humoral inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los títulos de IgG o IgG2c. Los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN fueron capaces de seroconvertir tras esta segunda estimulación, pero los títulos de anticuerpos generados post desafío en la fase memoria continuaron siendo significativamente inferiores a los generados por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Además, los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN fueron incapaces de inducir anticuerpos del subtipo IgG2c (**Fig. 1.5 B**).

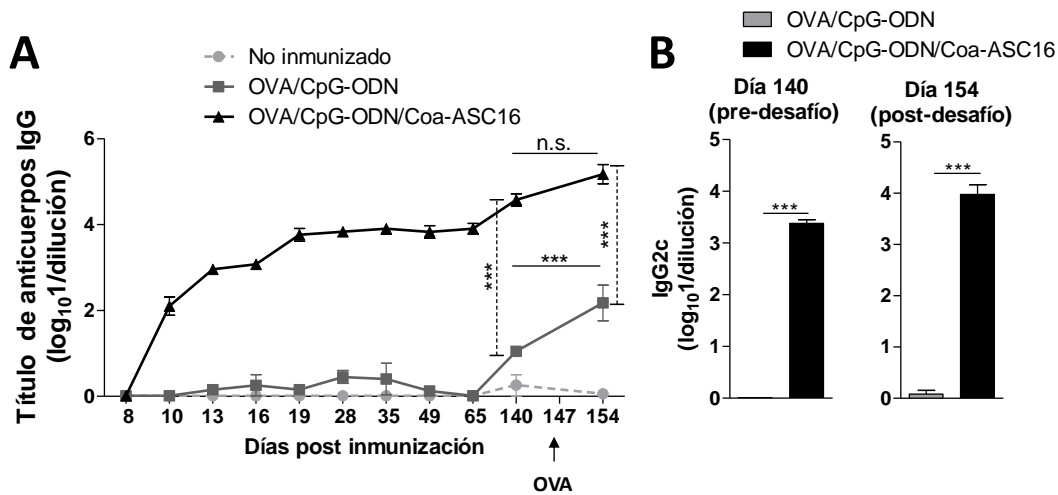


Figura 1.5. Respuesta humoral inducida con una única dosis de OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 147 post inmunización, los ratones fueron desafiados intraperitonealmente con OVA. Los animales fueron sangrados a distintos tiempos para la determinación de títulos de anticuerpos específicos de OVA mediante ELISA. **(A)** Cinética en plasma de anticuerpos IgG. **(B)** IgG2c al día 140 (pre-desafío) y 154 (post desafío) con OVA. Los datos representan la media \pm SEM de valores individuales (4 ratones por grupo de tratamiento) y son representativos de dos experimentos independientes. *** $p < 0,001$; ns: no significativo.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO I

En esta primera parte demostramos que la formulación del CpG-ODN en el Coa-ASC16 potencia sustancialmente su efecto adyuvante sobre la respuesta inmune humoral tanto en magnitud como en calidad manteniendo un balance equilibrado Th1/Th2. Adicionalmente, demostramos que la magnitud de los anticuerpos generados es independiente de la vía de señalización dada por IL-6 y que la formulación completa OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 permite la reducción de la dosis de antígeno hasta tres veces sin afectar la magnitud de la respuesta humoral y celular Th1 generada.

Además, hemos probado que el utilizar el CpG-ODN en esta formulación permite reducir el esquema de inmunizaciones de tres a una única dosis mostrando mantener la capacidad de generar una rápida seroconversión de anticuerpos y una respuesta humoral sostenida en el tiempo (memoria) tanto de IgG total como del subtipo IgG2c.

CAPÍTULO II

*Efecto adyuvante sobre la respuesta celular T CD8+
EFECTORA del CpG-ODN formulado en un sistema
nanoestructurado*

Como mencionamos previamente, la mayoría de las vacunas actuales exhiben su protección principalmente a expensas de la inmunidad humoral (110). Sin embargo, para un gran número de enfermedades infecciosas generadas por patógenos intracelulares como leishmaniasis, malaria, HIV y tuberculosis, así como cáncer, entre otras, precisan de una respuesta adicional celular T CD8+ para lograr su eliminación (4, 129).

Para lograr inducir este tipo de respuesta, las células T CD8+ vírgenes deben reconocer mediante su complejo receptor TCR/CD3 al péptido antigénico presentado por la APC en un contexto de MHC-I. Convencionalmente, los péptidos propios y no propios acceden a moléculas MHC-I tras la degradación endógena de proteínas en el citosol (130). Esto permite la detección por el sistema inmune de péptidos propios del organismo que sufren alguna alteración (caso que se da en células tumorales), o péptidos extraños, pertenecientes a patógenos que están infectando dicha célula y en algún momento toman contacto con el citosol (131). Dicho mecanismo de presentación es denominado “vía endógena de presentación antigénica”. Por otro lado, si el antígeno es exógeno (como el que utilizamos en este trabajo), será internalizado por las APCs vía endocitosis sin tomar contacto con el citosol para ser presentado en un contexto MHC-II incapaz de ser reconocido por células T CD8+. Por lo tanto, para llegar a ser cargado por moléculas MHC-I y activar linfocitos T CD8+ debe pasar por un proceso denominado “presentación cruzada”. Hasta el momento, se han definido concretamente al menos dos vías de presentación cruzada (130, 132). La primera, denominada vía canónica (vía endosoma-hacia-citosol), consiste en el transporte de antígenos exógenos desde vesículas endosomales hacia el citosol, donde son recortados y procesados por el proteosoma y subsecuentemente cargados en moléculas MHC-I en el RE (133). En la segunda, (vía proteosoma-independiente citosol-independiente), las DCs usan proteasas endosomales para procesar y cargar antígenos directamente en moléculas MHC-I en el compartimento endosomal (134). A pesar de que existen múltiples APCs capaces de realizar presentación cruzada, las células más eficientes para realizar este proceso in vivo son las DCs (135-137). Para lograr activar las células T CD8+, las APCs, en adición al MHC-I cargado con el péptido, deben contar con un nivel adecuado de moléculas coestimuladoras, las cuales aumentan su expresión tras la activación por

señales inflamatorias mediadas por citoquinas, interacciones célula-célula (asistencia mediada por células Th1) y/o activación directa por ligandos PRRs.

Brevemente, para que un adyuvante logre promover la diferenciación de células T CD8+ funcionales, en general, debe ser entregado junto con el antígeno formulado de tal forma que facilite su entrada a la vía de procesamiento MHC-I, activar a las DCs e inducir la producción de IFN- γ (6). El desarrollo de estrategias adyuvantes que cumplan con estas condiciones ha resultado ser una tarea muy difícil de cumplir para las vacunas modernas en base a subunidades y continúa siendo un campo en estudio.

En comparación con otros adyuvantes, el CpG-ODN está descrito como uno de los candidatos con mayor potencial en la promoción de una respuesta celular asociada a un perfil inmunológico Th1 (45, 138) con inducción de citoquinas como IFN- γ e IL-12 y, en ciertos casos, inducción de una respuesta de células T CD8+, incluso en la ausencia de la ayuda de células Th1 (139, 140). La inducción de la polarización de la respuesta Th hacia un perfil Th1, es tan fuerte que se mantiene incluso en la presencia de adyuvantes que normalmente promueven una respuesta Th2 como sales de aluminio (141). Además, está ampliamente descrito que la conjugación directa del CpG-ODN con el antígeno puede incrementar la captación de antígeno por DCs con consecuente aumento de presentación cruzada e inducción de respuesta mediada por células T CD8+ (142-144).

Sin embargo, no todas las clases de CpG-ODN son buenas inductoras de una respuesta celular T CD8+, especialmente los CpG-B, la cual utilizamos en nuestro trabajo. Es por ello que se han desarrollado multitud de estrategias para potenciar su actividad adyuvante para inducir un perfil Th1 y células T CD8+ (96).

En este trabajo, analizamos por primera vez la capacidad de esta nueva estrategia de formulación del CpG-B para inducir una respuesta celular T CD8+ con un antígeno exógeno soluble no particulado. Adicionalmente nos focalizamos en la caracterización de la calidad y magnitud de esa respuesta y en algunos de los posibles mecanismos involucrados en su inducción.

RESULTADOS DEL CAPÍTULO II

Respuesta celular T CD8+ inducida bajo un esquema de tres inmunizaciones

Previamente, nuestro grupo ha demostrado que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 tiene la capacidad de promover la polarización hacia una respuesta celular de perfil Th1 (108). Dicha respuesta está fuertemente asociada a la generación de una respuesta inmune dirigida a combatir microorganismos intracelulares con alta producción de citoquinas involucradas en la activación de macrófagos, células NK y linfocitos T CD8+. Por consiguiente, investigamos su capacidad de generar una respuesta adaptativa del tipo T CD8+.

La respuesta efectora ejercida por linfocitos T CD8+ puede dividirse en dos ramas, citotoxicidad directa (medida a través de su capacidad de lisar células) o indirecta (promovida por medio de citoquinas proinflamatorias que actúan sobre otras células del sistema inmune) (145, 146). En primer lugar, evaluamos la capacidad funcional de la respuesta celular T CD8+ inducida por nuestra estrategia adyuvante en comparación con otras formulaciones. Para ello, se inmunizaron ratones C57BL/6 utilizando el mismo esquema de tres inmunizaciones previo (en los días 0, 7 y 14) con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16. A continuación, siete días después de la última inmunización, se realizó un ensayo funcional in vivo de lisis celular mediado por células T CD8+. Como resultado, podemos observar que, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron un porcentaje de lisis celular específica 4 veces mayor a los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/Coa-ASC16 (**Fig. 2.1 A**). Además, podemos destacar que los animales inmunizados con la formulación OVA/Coa-ASC16, en ausencia de CpG-ODN, no logran generar una respuesta T CD8+ citotóxica. Estos resultados indican nuevamente que la presencia del CpG-ODN es necesaria promover la respuesta de células T CD8+. Adicionalmente, en representación de la capacidad efectora indirecta de dichas células T CD8+ se midió la secreción de IFN- γ tras reestimulación ex vivo con el péptido inmunodominante de OVA clase I (SIINFEKL) a partir de esplenocitos provenientes de los animales inmunizados. El péptido SIINFEKL es presentado por APCs en un contexto MHC-I directamente a células T CD8+ cuyo TCR es específico para dicho péptido. Consistentemente con los resultados anteriores de lisis celular, los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron una mayor producción de la

citoquina efectora IFN- γ que los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/Coa-ASC16 (**Fig. 2.1 B**). A partir de estos resultados, podemos concluir que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es capaz de inducir una fuerte respuesta celular efectora T CD8+ y que ésta, es dependiente de la presencia del CpG-ODN.

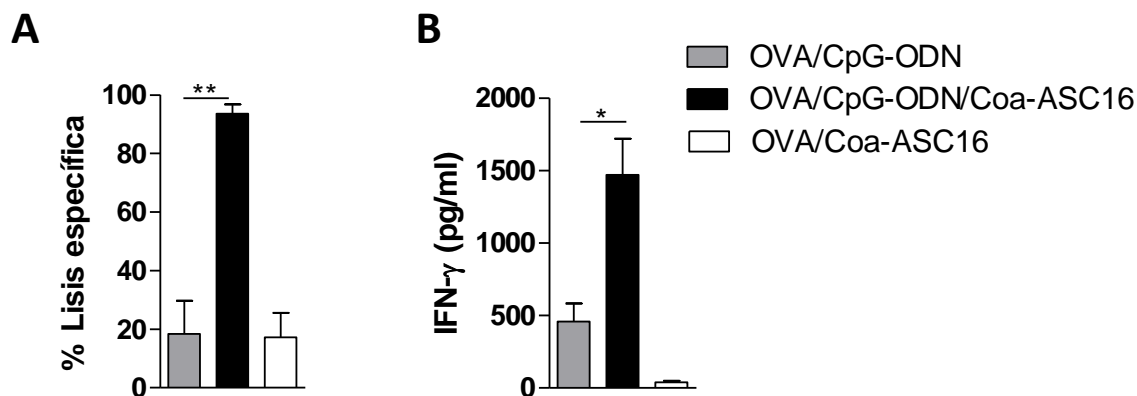


Figura 2.1. Capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir una respuesta celular T CD8+ con un esquema de tres inmunizaciones. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA/Coa-ASC16 a los días 0, 7 y 14. Al día 21 después de la primera inmunización, se determinó la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+ mediante un ensayo de citotoxicidad in vivo. **(A)** Citotoxicidad expresada como el porcentaje de lisis específica. **(B)** Secreción ex vivo de IFN- γ por suspensiones de esplenocitos reestimulados con el péptido SIINFEKL medido por ELISA. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p < 0,05; **p < 0,01.

Estudio de participación de la vía de señalización mediada por IL-6 en la promoción de una respuesta celular mediada por células T CD8+

Como mencionamos en el capítulo I, la plataforma de Coa-ASC16 no es inmunológicamente inerte, sino que es detectada por el sistema inmune innato con la consecuente producción local de altos niveles de IL-6 (109). Dado que se ha descrito que la citoquina IL-6 participa en la diferenciación citotóxica de células T CD8+ inducida por adyuvantes como monofosforil lípido A (MPL) (147) y para el control de ciertas infecciones virales como el virus de herpes simple (148), nos propusimos investigar su posible papel en la respuesta de células T CD8+ inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Con este fin, ratones WT o *Il-6*^{-/-} fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Sorprendentemente, no se encontró diferencia en el

porcentaje de lisis celular ejercida por los linfocitos T CD8+ entre las diferentes cepas de ratones (**Fig. 2.2 A**). Asimismo, ambas cepas produjeron valores similares de IFN- γ tras reestimulación ex vivo con el péptido SIINFEKL (**Fig. 2.2 B**). Estos resultados sugieren que la señalización por medio de la citoquina IL-6 no es necesaria para la promoción de la respuesta mediada por linfocitos T CD8+ inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16.

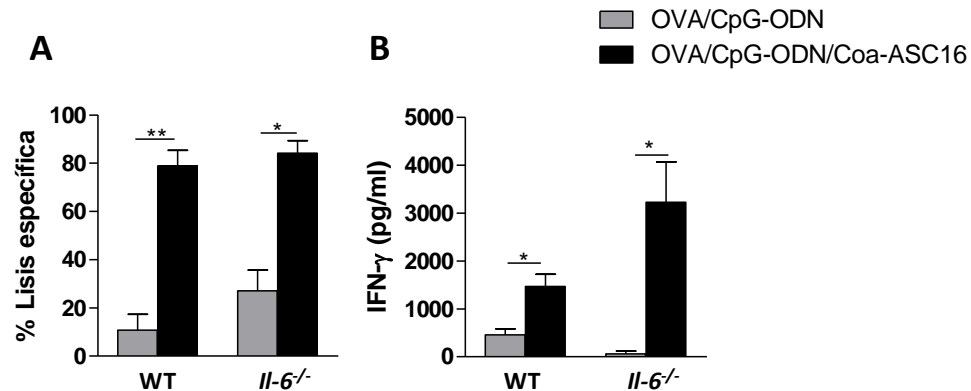


Figura 2.2. Estudio de la participación de la vía de señalización por medio de IL-6 en la generación de la respuesta celular T CD8+ inducida por OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales WT o Il-6^{-/-} fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en los días 0, 7 y 14. Al día 21 después de la primera inmunización se determinó la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+ mediante un ensayo de citotoxicidad in vivo. **(A)** Citotoxicidad expresada como el porcentaje de lisis específica. **(B)** Secreción ex vivo de IFN- γ por suspensiones de esplenocitos reestimuladas con el péptido SIINFEKL medido por ELISA. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3-4 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) de la solución OVA/CpG-ODN y sus componentes tras el proceso de calentamiento implicado en el proceso de formulación de OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

En vista de los resultados obtenidos sobre la respuesta celular T CD8+ utilizando un antígeno exógeno no particulado y un CpG-B, (no caracterizado por inducir este tipo de respuesta con antígenos solubles), nos preguntamos cuáles eran las posibles explicaciones para que el coagel estuviera activando tan fuertemente esta respuesta T.

Dado que la formulación del antígeno OVA y el adyuvante CpG-ODN con el coagel requiere de una etapa de calentamiento, surge el interrogante de si este proceso podría

estar afectando la estructura nativa del antígeno por desnaturalización y posterior agregación de la proteína o promover interacciones entre los componentes OVA y CpG-ODN. Para ello, se analizó la solución OVA/CpG-ODN tras previo calentamiento a 80°C por 15 min mediante PAGE en condiciones no desnaturalizantes. Tras comparar las corridas en el gel de las soluciones OVA/CpG-ODN tratada y no tratada con calor, podemos observar que no hay diferencias entre las velocidades de migración de los diferentes componentes (**Fig. 2.3 A**). Estos resultados sugieren que las estructuras e interacciones naturales de la proteína y el ODN no se ven significativamente alteradas por el calor. Sin embargo, dadas las propiedades fisicoquímicas que presenta el coagel, hasta el momento no hemos logrado utilizar una técnica que nos brinde información sobre las posibles interacciones formadas entre los distintos componentes OVA, CpG-ODN y coagel dentro de la formulación completa. La estructura y consistencia semisólida del coagel impiden su análisis por PAGE así como por la mayoría de los métodos tradicionales de microscopía. Es por esto, que nuestros resultados son sólo aproximaciones de lo que podría estar ocurriendo en la verdadera formulación y, por lo tanto, deben tomarse con precaución.

Por otro lado, como hemos descrito previamente, el ASC16 se comporta como un surfactante que tiene la propiedad de perturbar membranas formadas por bicapas lipídicas (149, 150). Basándonos en sus propiedades fisicoquímicas que indican que es una nanoestructura abierta, hipotetizamos que el coagel no logra ingresar a las células. Sin embargo, es necesario realizar estudios más profundos para corroborar esta idea. Teniendo en cuenta reportes anteriores de nuestro grupo en los que el coagel induce lisis celular local *in vivo* (109), nos preguntamos si este fenómeno era dependiente del pH del entorno. Pues, de poder ingresar a las células, su efecto surfactante podría facilitar el ingreso del antígeno hacia distintos compartimentos celulares como citosol, endosomas o lisosomas, cada uno con su respectivo pH. Con este fin, realizamos un simple ensayo de hemólisis en el que incubamos glóbulos rojos con un volumen fijo de Coa-ASC16 a distintos pH. Podemos observar que las propiedades tensioactivas del coagel permanecen intactas dentro de un rango de pH de entre 6,8 y 7,4 (pH correspondiente a endosomas tempranos) y que el efecto de lisis celular comienza a atenuarse recién en condiciones de alta acidez (pH= 6,4; correspondiente a endosomas

tardíos o lisosomas) (**Fig. 2.3 B**). Estos resultados demuestran la capacidad lítica del Coa-ASC16 sobre los glóbulos rojos apoyando resultados previos del grupo donde el Coa-ASC16 induce localmente la liberación de DAMPs en forma de DNA de doble cadena tras causar lisis celular (109).

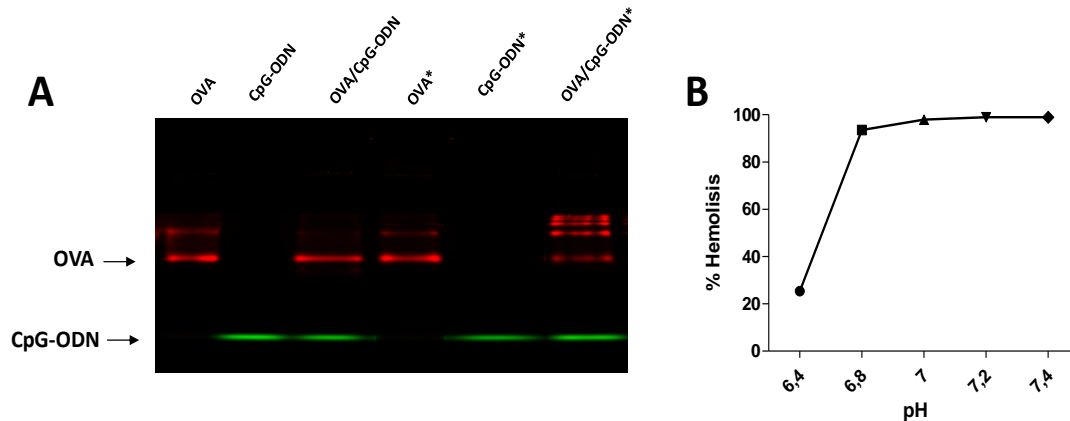


Figura 2.3. PAGE en condiciones nativas de los distintos componentes de la formulación. Capacidad hemolítica del coagel. (A) Corrida de los diferentes componentes utilizados en las vacunas con y sin tratamiento térmico resueltos en un gel de poliacrilamida al 20%. Las formulaciones se prepararon usando OVA marcada con IRDye®680RD y CpG-ODN 1826 marcado con IRDye®800CW en el extremo 5' y se visualizaron usando un sistema de Imagen por Infrarrojo ODYSSEY®. **(B)** Porcentaje de hemólisis inducida por el Coa-ASC16 a diferentes pH tomando como 100% de lisis celular a las muestras tratadas con Tritón X-100 al 20%.

Internalización in vivo de OVA y CpG-ODN por DCs tras inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

El direccionamiento simultáneo del CpG-ODN y la OVA hacia la misma APC ha demostrado ser una estrategia eficaz para la inducción de una fuerte respuesta celular del tipo T CD8+ (144, 151-154). Es por ello que, nos preguntamos si la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 era capaz de facilitar la internalización simultánea de antígeno y adyuvante por medio de DCs. Este fenómeno suele observarse cuando los componentes son unidos covalentemente entre sí o entregados a las células del sistema inmune innato dentro de estructuras cerradas como micro o nanopartículas que ingresan a la célula como un todo. Nuestro sistema no cumple ninguna de estas características, sin embargo, dada la fuerte respuesta mediada por células T CD8+ inducida por la formulación con el coagel hipotetizamos que existe un fenómeno de

internalización simultáneo de OVA y CpG-ODN por DCs (ya sea migratorias originarias del sitio de inyección como residentes de los LNs). Para comprobar esta teoría, se inmunizaron ratones únicamente en la zona inguinal con Alexa Fluor-647-OVA/Alexa Fluor-488-CpG-ODN o Alexa Fluor-647-OVA/Alexa Fluor-488-CpG-ODN/Coa-ASC16. Tres días post inmunización, recolectamos los LNs inguinales drenantes para evaluar por citometría de flujo la población de DCs cargadas con OVA y/o CpG-ODN en ambos grupos de inmunización. Nuestros resultados indican que el porcentaje de DCs en los LNs drenantes no se ve alterado por ninguna de las estrategias de inmunización (**Fig. 2.4 A**) sino que la diferencia recae en el número total que se ve significativamente aumentado cuando se inmuniza con la nanoestructura (**Fig. 2.4 B**). Cuando analizamos las poblaciones de DCs simple positivas tanto en porcentaje como células totales para OVA (**Fig 2.4 C y D**) o para CpG-ODN (**Fig. 2.4 E y F**) observamos que sólo los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 fueron capaces de internalizar eficientemente los distintos componentes. Notablemente, la formulación con el coagel no solamente indujo un incremento en el grado de internalización de OVA o de CpG-ODN, sino que podemos observar que casi la totalidad de las DCs encontradas en los LNs drenantes son OVA+CpG-ODN+ demostrando una internalización simultánea de ambos componentes en la misma célula. En cambio, la frecuencia (porcentaje y número total) de DCs doble positivas en animales inmunizados con OVA/CpG-ODN prácticamente no difieren del grupo control no inmunizado resaltando la importancia

de la nanoestructura para incrementar el proceso de captura tanto de antígeno como de adyuvante (**Fig.2.4 G y H**).

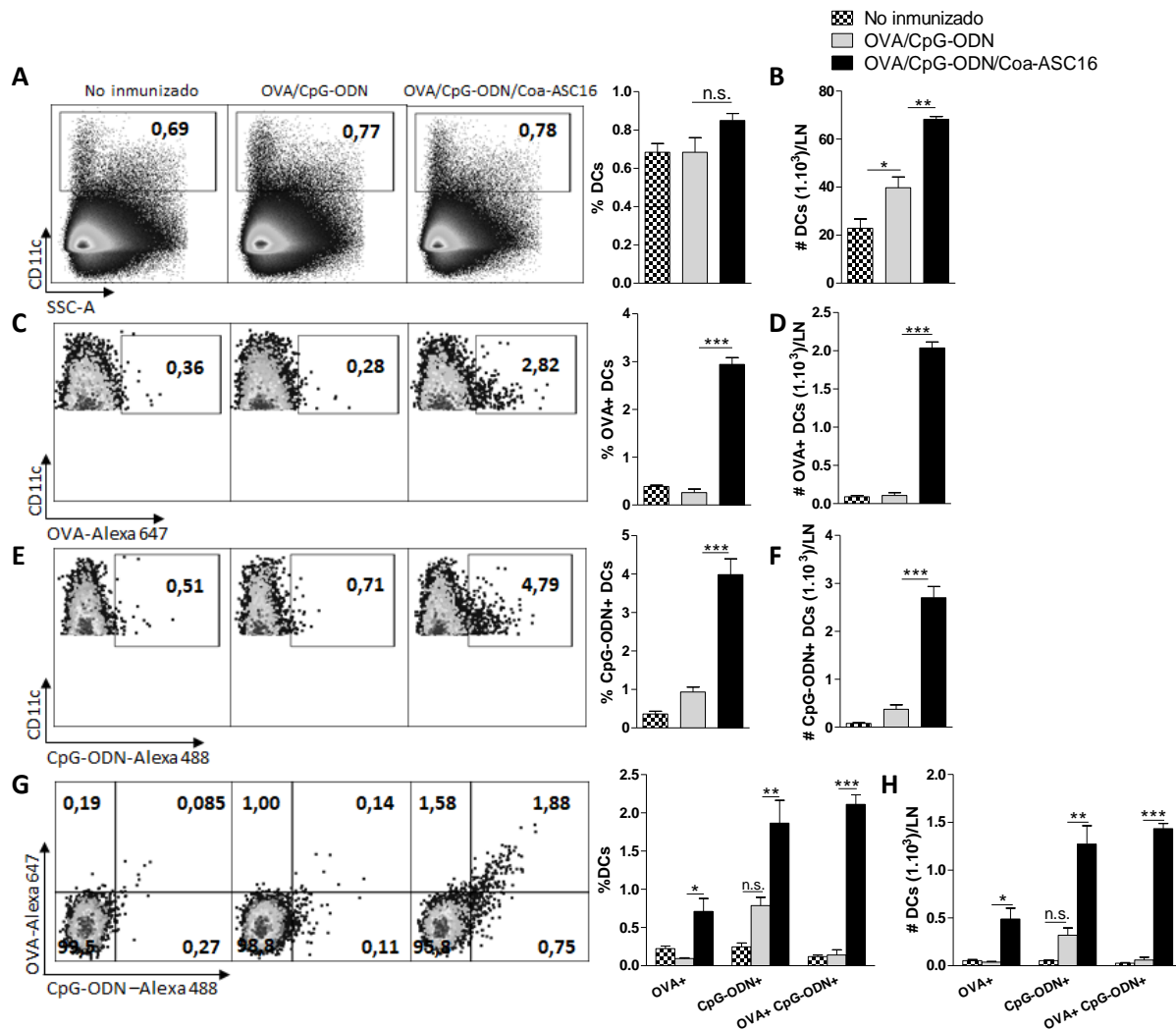


Figura 2.4. Captura in vivo de OVA y CpG-ODN por DCs con diferentes estrategias adyuvantes. Animales C57BL/6 fueron inyectados vía s.c. con Alexa-647-OVA/Alexa-488-CpG-ODN u Alexa-647-OVA/Alexa-488-CpG-ODN/Coa-ASC16 en ambas zonas inguinales. Tres días después, se recogieron células de los LNs inguinales drenantes para el análisis por citometría de flujo. Las barras muestran porcentaje y número total de la población de DCs (**A y B**), población total de DCs cargadas con OVA (**C y D**), población total de DCs cargadas con CpG-ODN (**E y F**) y población de DCs simples y dobles positivas para OVA y CpG-ODN (**G y H**). Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s.: no significativo.

Respuesta celular T CD8+ inducida por una sola inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

Como mencionamos previamente, por motivos de practicidad y costos, nos propusimos evaluar la capacidad de esta novedosa estrategia adyuvante de generar una respuesta T CD8+ citotóxica con una sola inmunización.

Inicialmente, nos preguntamos si una única dosis utilizando esta estrategia adyuvante era suficiente para desencadenar una buena respuesta funcional de linfocitos T CD8+. Con este objetivo, se realizó un ensayo de citotoxicidad in vivo al día 7 post inmunización con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Sorprendentemente, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron un porcentaje de lisis específica de aproximadamente el 70% mientras que los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN no lograron obtener una respuesta de citotóxica detectable (**Fig. 2.5 A**). Consistentemente con este resultado, la producción ex vivo de IFN- γ en cultivos de esplenocitos de animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 fue significativa mientras que la de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN fue prácticamente indetectable (**Fig. 2.5 B**).

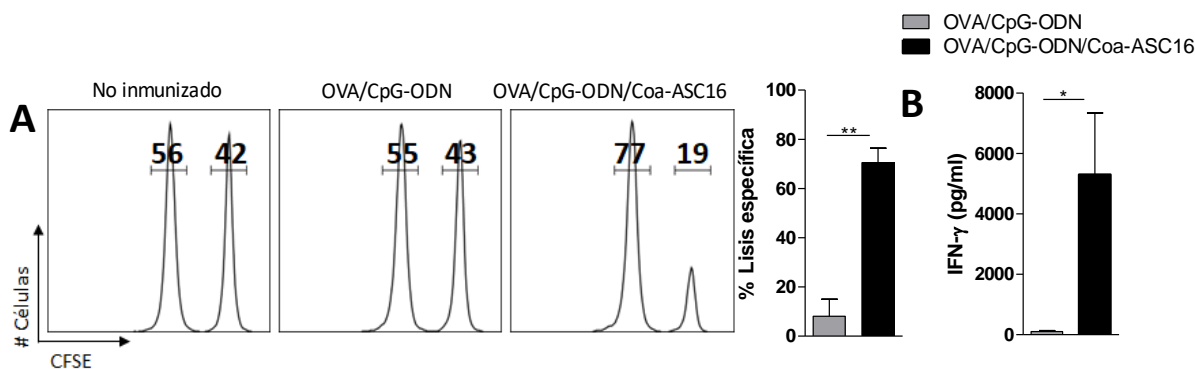


Figura 2.5. Capacidad de la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir una respuesta celular T CD8+ con una única dosis. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con una única dosis de OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0. Siete días después se realizó un ensayo de citotoxicidad in vivo. **(A)** Porcentaje de lisis específica y **(B)** producción ex vivo de IFN- γ de esplenocitos tras reestimulación específica con el péptido SIINFEKL. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Como control de que la respuesta citotóxica observada en estos ensayos sea exclusivamente mediada por células T CD8+ se realizó un ensayo de citotoxicidad in vivo suplementario en ratones *Cd8 α ^{-/-}* inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 utilizando ratones WT como control positivo. En ausencia de linfocitos T CD8+ no se observa lisis celular específica (**Fig. 2.6**) demostrando que la citotoxicidad observada está puramente mediada por dichas células y no hay intervención de otras vías como citotoxicidad mediada por anticuerpos.

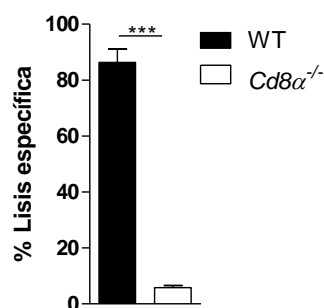


Figura 2.6. La actividad citotóxica inducida tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 está exclusivamente mediada por células T CD8+. Animales WT o *Cd8 α ^{-/-}* fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0. Porcentaje de lisis específica tras un ensayo de citotoxicidad in vivo 7 días post inmunización. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes realizados. *** $p < 0,001$.

Análisis de la dependencia de linfocitos Th para promover la respuesta celular T CD8+ tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

En general, la activación de células T CD8+ requiere del aporte de una gran cantidad de señales coestimuladoras que dependen en gran parte de la asistencia mediada por células Th. Sin embargo, está ampliamente descrito que los agonistas sintéticos del receptor TLR9 tienen la capacidad de activar APCs para generar una respuesta de células T CD8+ en forma independiente de Th, incluso a partir de antígenos solubles (139, 140). Para examinar si la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 era capaz de inducir este tipo de respuesta, realizamos un ensayo funcional de citotoxicidad in vivo al día 7 post inmunización en ratones cuyas células T CD4+ fueron previamente eliminadas por tratamiento con anticuerpos anti-CD4 (α CD4) o tratados con el control de isotipo IgG. Los ratones deficientes de linfocitos T

CD4+ al momento de la inducción de la respuesta inmune específica, mostraron un porcentaje de lisis celular específica comparable con aquellos tratados con el control de isotipo (**Fig. 2.7 A**). Estos resultados demuestran que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es capaz de inducir una respuesta primaria de linfocitos T CD8+ en forma independiente de Th. Consistentemente con este resultado, la secreción de IFN- γ ex vivo de esplenocitos reestimulados con el péptido SIINFEKL no se vio afectada por la ausencia de células T CD4+ (**Fig. 2.7 B**). En la **Fig. 2.7 C** se muestra el control de depleción de células T CD4+ en sangre al día de la inmunización.

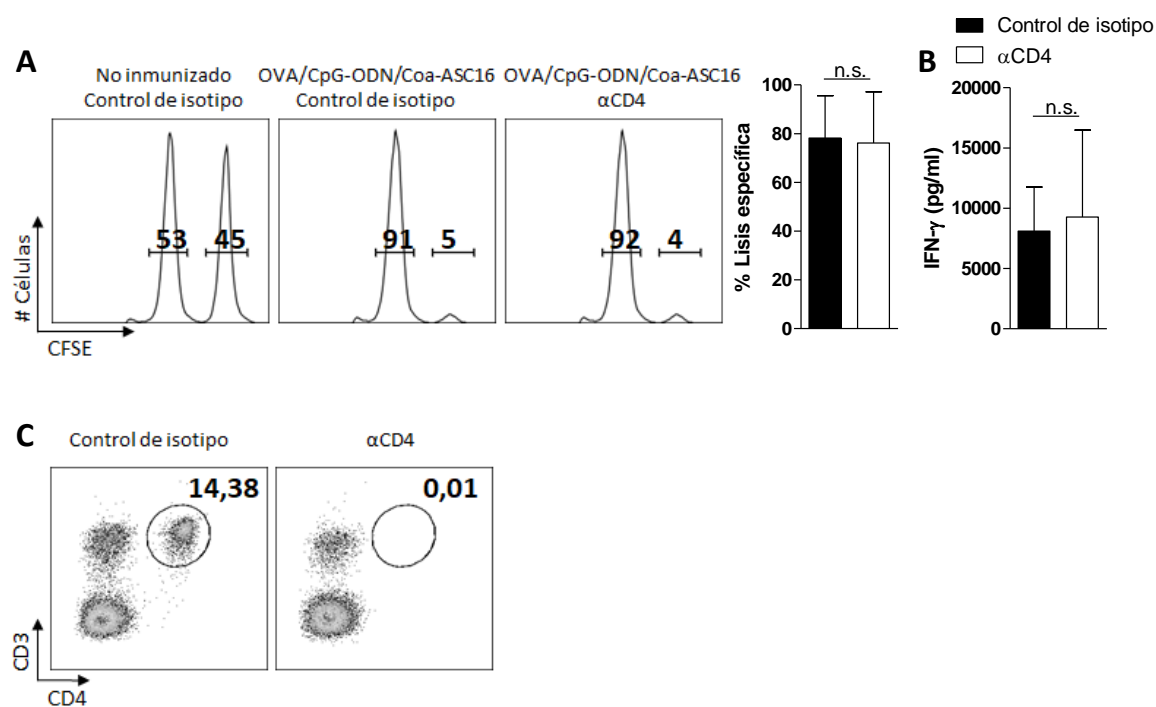


Figura 2.7. Estudio de la participación de células Th en la generación de la respuesta celular T CD8+ efectora tras inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 previamente tratados con anticuerpos anti-CD4 o con el control de isotipo IgG fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0. **(A)** Porcentaje de lisis específica de antígeno tras un ensayo de citotoxicidad in vivo al día 7 post inmunización. **(B)** Producción de IFN- γ ex vivo de esplenocitos tras reestímulo con el péptido SIINFEKL. **(C)** Control de depleción de células T CD4+ al momento de la inmunización; los dot plot representan la población de células T CD4+ en sangre al día 7 (día de la inmunización) de los animales tratados con anti-CD4 o con el control de isotipo. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. n.s.: no significativo.

Participación de la vía de señalización impartida por IFN-I en la promoción de la respuesta de células T CD8+ inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

Dentro de las citoquinas descritas como esenciales en la promoción de una respuesta inmune del tipo T CD8+ citotóxica podemos mencionar a los IFN-I. Dichas citoquinas pueden actuar directamente sobre las células T CD8+ como tercera señal de activación promoviendo diferentes funciones tales como supervivencia, capacidad citotóxica y producción de IFN- γ o indirectamente sobre las APCs facilitando procesos de maduración, presentación cruzada y migración (155-157). Dada la robusta respuesta de células T CD8+ observada por la inmunización utilizando esta plataforma de vacuna nanoestructurada, decidimos investigar si la vía de señalización de IFN-I era requerida para esta actividad adyuvante. Con este objetivo se realizó un ensayo funcional de citotoxicidad in vivo en ratones deficientes para el receptor de IFN-I (*Ifnar1*^{-/-}) siete días post inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 utilizando ratones WT como control positivo. Podemos observar por la completa ausencia de lisis específica de antígeno en los animales *Ifnar1*^{-/-} que la respuesta de células T CD8+ se ve totalmente suprimida en ausencia de señalización mediada por IFN-I (**Fig. 2.8 A**). En consistencia con este resultado, tampoco se detectó secreción ex vivo de IFN- γ en ratones *Ifnar1*^{-/-} inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (**Fig. 2.8 B**). Estos resultados sugieren que la capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para generar una respuesta inmune mediada por células T CD8+ está altamente asociada a la inducción de IFN-I.

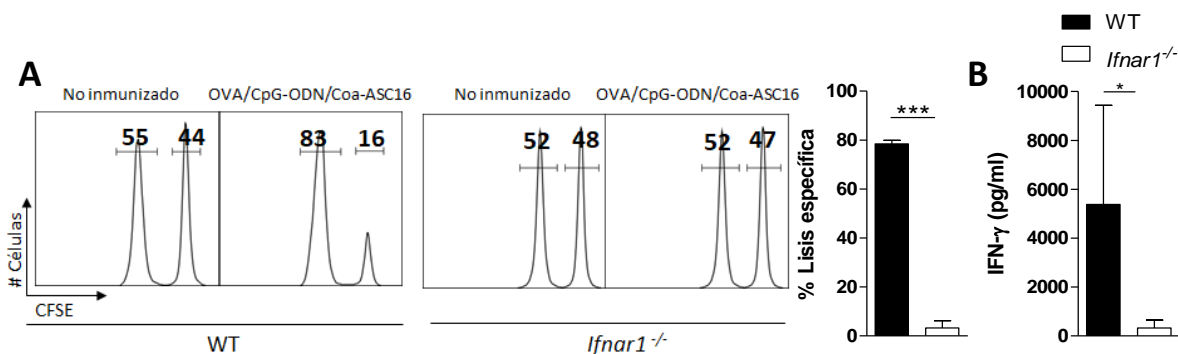


Figura 2.8. Estudio de la dependencia de la vía de señalización mediada por IFN-I para la generación de la respuesta celular T CD8+ inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 WT o *Ifnar1*^{-/-} fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Siete días post inmunización se realizó un ensayo de citotoxicidad in vivo. **(A)** Porcentaje de lisis específica y **(B)** secreción ex vivo de IFN-γ tras reestímulo de esplenocitos con el péptido SIINFELK. Los datos muestran la media ± SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes realizados. *p<0,05; ***p<0,001.

Caracterización de la respuesta celular T CD8+ inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

Una vez demostrada la capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 para inducir una respuesta efectora del tipo T CD8+ nos propusimos caracterizar dicha respuesta mediante el análisis tanto de su magnitud como de su calidad y eficacia. La magnitud de la respuesta celular T CD8+ fue evaluada mediante el uso de tetrámeros K^b-SIINFELK (a lo largo del trabajo me referiré a esta población como simplemente células T CD8+ tetrámero positivas). El tetrámero K^b-SIINFELK consiste en complejos MHC-I cargados con el péptido SIINFELK marcados con un fluorocromo y es, por lo tanto, una herramienta para detectar los clones T CD8+ específicos del péptido inmunodominante clase I de OVA. La calidad fue analizada mediante el grado de polifuncionalidad (capacidad de producción simultánea de moléculas efectoras) presentado por las células T CD8+ generadas. Finalmente, la eficacia de dicha respuesta fue evaluada en la siguiente sección mediante un modelo de infección con la bacteria intracelular *Listeria monocytogenes* modificada genéticamente para expresar el antígeno OVA (LM-OVA).

Adicionalmente, en primera instancia, evaluamos la magnitud y calidad de la respuesta generada por las diferentes estrategias adyuvantes (OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16) comparándolas a su vez, con la respuesta primaria de células T CD8+ inducida por la infección con una cepa atenuada de *LM-OVA* ($\Delta ActA$ *LM-OVA*). Dicha cepa, es deficiente de la proteína ActA, factor responsable de su motilidad y diseminación célula a célula volviéndola débilmente infecciosa y, por lo tanto, no letal. Para ello, los ratones fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o infectados vía i.v. con 5.000 unidades formadoras de colonias (UFC) de $\Delta ActA$ *LM-OVA*. Siete días después del tratamiento, los animales fueron sacrificados para la extracción del bazo y posterior análisis de células tetrámero positivas. Adicionalmente se realizó una tinción intracelular de citoquinas tras reestímulo ex vivo de suspensiones de esplenocitos con el péptido SIINFEKL por 5 hs. En concordancia con los resultados de citotoxicidad obtenidos previamente, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron un porcentaje (**Fig. 2.9 A**) y número total (**Fig. 2.9 B**) sustancialmente mayor de células T CD8+ tetrámero positivas que los otros grupos de tratamiento.

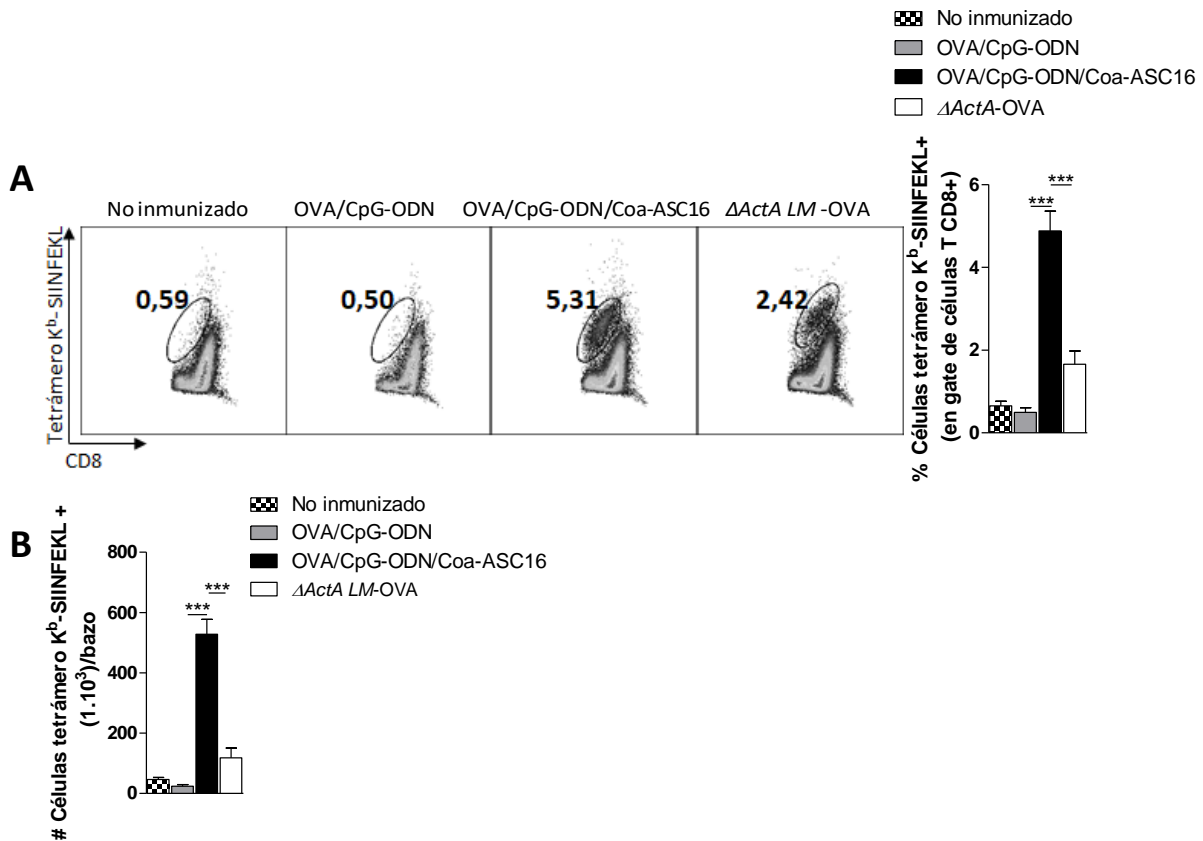


Figura 2.9. Magnitud de la respuesta celular T CD8+ efectora inducida tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o infectados vía i.v. con 5000 UFC/ratón de $\Delta ActA$ LM-OVA al día 0. **(A)** Dot plot representativos de un animal de cada grupo de tratamiento y porcentaje de células T CD8+ tetramero K^b-SIINFEKL positivas en bazo al día 7 post tratamiento. **(B)** Número total de células K^b-SIINFEKL positivas en bazo al día 7 post tratamiento. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (4 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes realizados. ***p<0,001.

Adicionalmente, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron una frecuencia de células T CD8+ triple (IFN- γ +TNF- α +IL-2+), doble ((IFN- γ +TNF- α +) e (IFN- γ +IL-2+)) y simple (IFN- γ +) positiva significativamente superior a la de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN (**Fig. 2.10 A-B**). En comparación con los animales infectados con $\Delta ActA$ LM-OVA, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron una respuesta de células T CD8+ triple (IFN- γ +TNF- α +IL-2+) y doble (IFN- γ +IL-2+) significativamente superior tanto en porcentaje

como en valor absoluto (**Fig. 2.10 A y C**). Por otro lado, la frecuencia observada tanto en porcentaje (**Fig. 2.10 A**) como en número total (**Fig. 2.10 C**) de células T CD8+ polifuncionales fue muy reducida en los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. Además, puede observarse la diferencia en el patrón de secreción de citoquinas entre las diferentes estrategias de inmunización y el modelo de infección (**Fig. 2.10 B**). Ambas formulaciones de vacunación (OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16) muestran patrones de producción de citoquinas con mayor población de células multifuncionales. En cambio, los animales infectados con $\Delta ActA$ LM-OVA mostraron un patrón de citoquinas mayormente simple positivo con alta producción de IL-2 y de IFN- γ consistente con la necesidad de una respuesta inmediata más bien efectora con alta tasa de proliferación de células T (IL-2+). La frecuencia de células T CD8+ productoras de citoquinas fue obtenida mediante el método de boolean gating mediante el software FlowJo V10; en la **Fig. 2.11** se muestra la estrategia de gating utilizada.

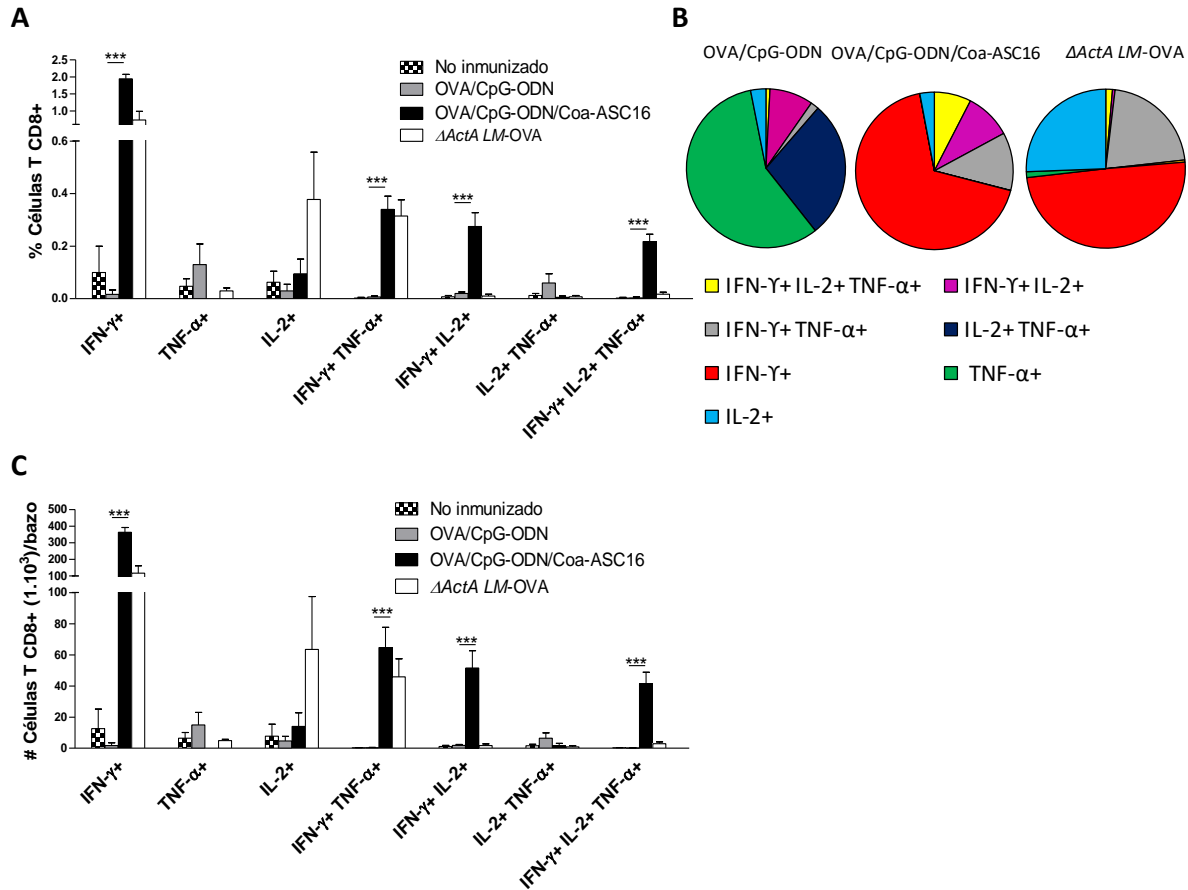


Figura 2.10. Calidad de la respuesta celular T CD8+ efectora inducida tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o infectados vía i.v. con 5000 UFC/ratón de $\Delta ActA$ LM-OVA al día 0. Siete días post tratamiento, los animales fueron sacrificados para extracción del bazo. Análisis multiparamétrico por citometría de flujo de células T CD8+ específicas del péptido SIINFEKL. **(A)** Porcentaje de células T CD8+ productoras de cada una de las siete combinaciones posibles de las citoquinas IFN- γ , TNF- α y IL-2 dentro de la población total de células T CD8+ calculadas por el método boolean gating tras substracción de los valores de expresión basales. **(B)** Fracción de células T CD8+ productoras de las siete combinaciones posibles de citoquinas dentro de la población T CD8+ positiva para al menos una de las citoquinas estudiadas. **(C)** Número total de células T CD8+ productoras de cada una de las siete combinaciones posibles de las citoquinas IFN- γ , TNF- α y IL-2 dentro de la población total de células T CD8+ calculadas por el método boolean gating tras substracción de los valores de expresión basales. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (4 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *** $p < 0,001$.

En conjunto, estos resultados demuestran que la plataforma nanoestructurada es una potente herramienta para aumentar en magnitud y calidad la respuesta mediada por células T CD8+ efectoras inducidas por CpG-ODN.

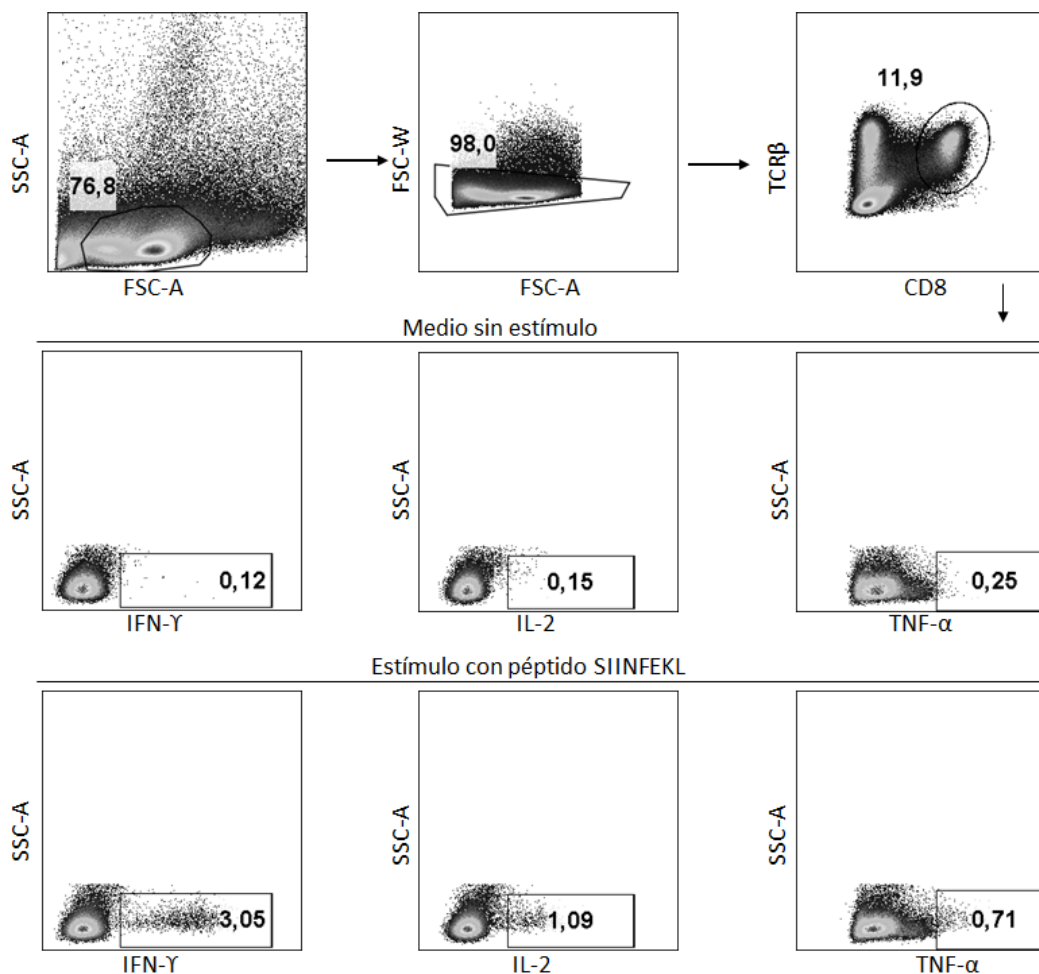


Figura 2.11. Estrategia de gating utilizada para el análisis de la producción de citoquinas intracelulares por células T CD8+ mostrado en Fig. 2.10. Los dot plot son representativos de un animal inmunizado con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Los gates muestran la selección utilizada para los cálculos por medio del método boolean gating.

Evaluación de la eficacia de la respuesta mediada por células T CD8+ efectoras inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en un modelo de infección con LM-OVA

Aunque la respuesta inmune innata cumple un rol importante en el control inicial de la infección por *L. monocytogenes*, su completa eliminación requiere de la

respuesta adaptativa mediada por células T CD8⁺ (158). Es por ello que elegimos este modelo para testear la eficacia de la respuesta protectora impartida por células T CD8⁺ inducidas por la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en comparación con su contraparte soluble OVA/CpG-ODN.

Para ello, ratones control o inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o CpG-ODN/Coa-ASC16 fueron infectados con *LM*-OVA vía i.v. al día 7 post inmunización. Dos días después de la infección, los ratones fueron sacrificados para la recolección de bazo e hígado. El bazo fue utilizado para la medida y caracterización de la respuesta de células T CD8⁺ inducida por las distintas formulaciones mientras que el hígado fue utilizado para medir la carga bacteriana remanente. El análisis de la respuesta de células T CD8⁺ en el bazo indica que la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es capaz de desencadenar una mayor expansión de células T CD8⁺ tetrámero positivas que las otras formulaciones caracterizada por aumento tanto en porcentaje (**Fig. 2.12 A**) como número total (**Fig. 2.12 B**).

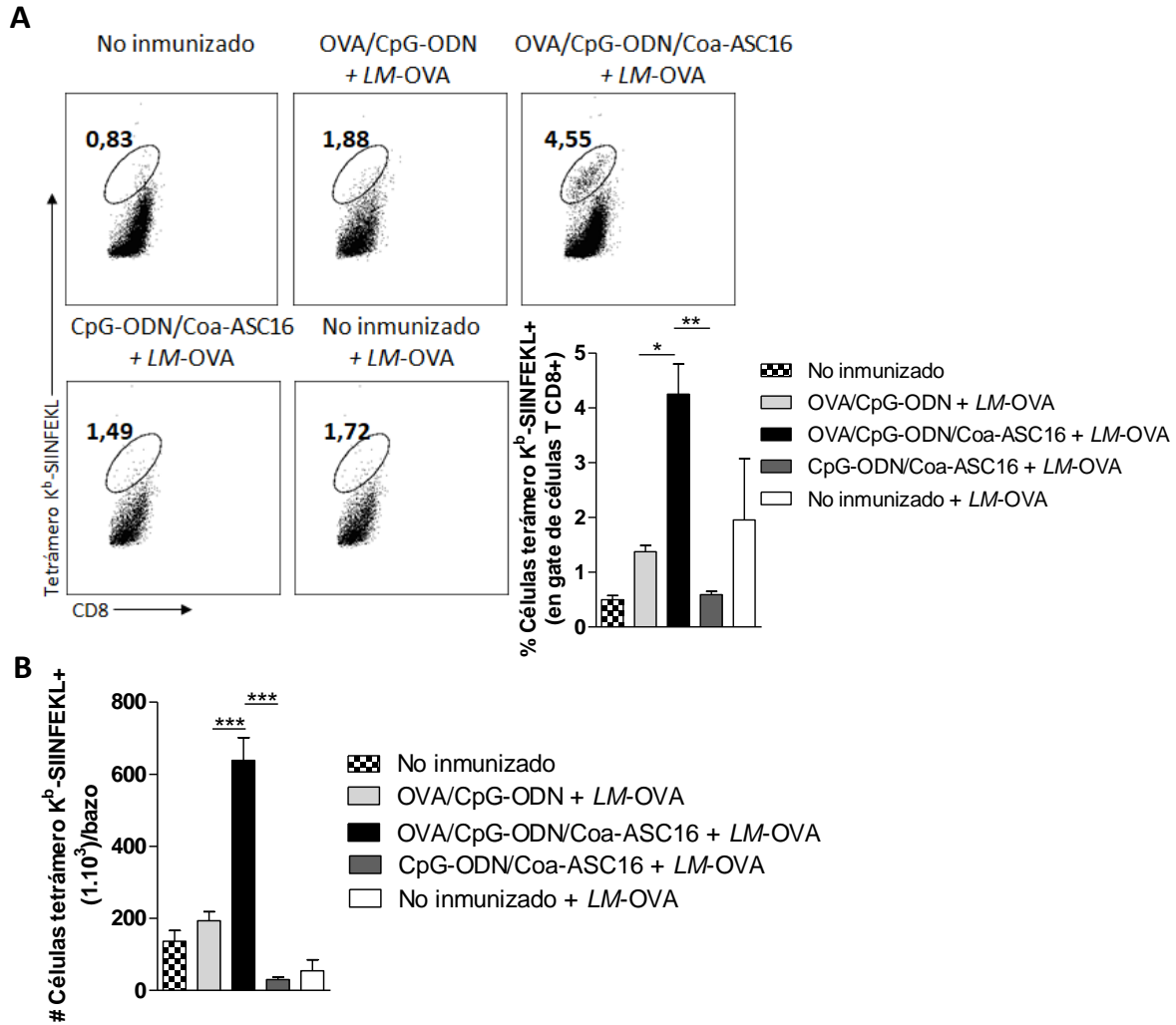


Figura 2.12. Magnitud de la respuesta celular T CD8⁺ inducida por diferentes estrategias adyuvantes frente a una infección con LM-OVA. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0. Siete días post inmunización los animales inmunizados más un grupo control no inmunizado fueron infectados con una dosis letal de LM-OVA (10⁵ UFC/ratón). Dos días post infección, los animales fueron sacrificados para la extracción de bazo. **(A)** Dot plot representativos de un animal de cada grupo de tratamiento y porcentaje de células tetrámero K^b-SIINFEKL positivas dentro del gate de células T CD8⁺. **(B)** Número total de células T CD8⁺ tetrámero K^b-SIINFEKL positivas en bazo. Los datos muestran la media ± SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *p<0,05; **p<0.01; ***p<0,001.

Asimismo, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron una mayor frecuencia de células T CD8⁺ polifuncionales con un incremento en la tasa de

desgranulación (medida indirectamente por medio del marcador de superficie CD107a) y producción simultánea de las citoquinas efectoras IFN- γ y TNF- α en comparación con los demás grupos de tratamiento tanto en porcentaje (**Fig. 2.13 A**) como número total (**Fig. 2.13 C**). Además, es posible observar que el patrón de expresión de moléculas efectoras en células T CD8⁺ es similar entre las dos formulaciones de vacunación que contienen al antígeno (**Fig. 2.13 B**). La única excepción entre estas dos estrategias es la tendencia de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 de producir células T CD8⁺ con mayor capacidad de desgranulación. Por otro lado, los animales inyectados con el adyuvante en ausencia del antígeno (CpG-ODN/Coa-ASC16) mostraron un patrón de respuesta celular T CD8⁺ similar a la de los animales control infectados con *LM*-OVA consistente con la necesidad de una respuesta efectora primaria necesaria para controlar una infección inminente (**Fig. 2.13 B**). En la **Fig. 2.14** se muestra la estrategia de gating utilizada.

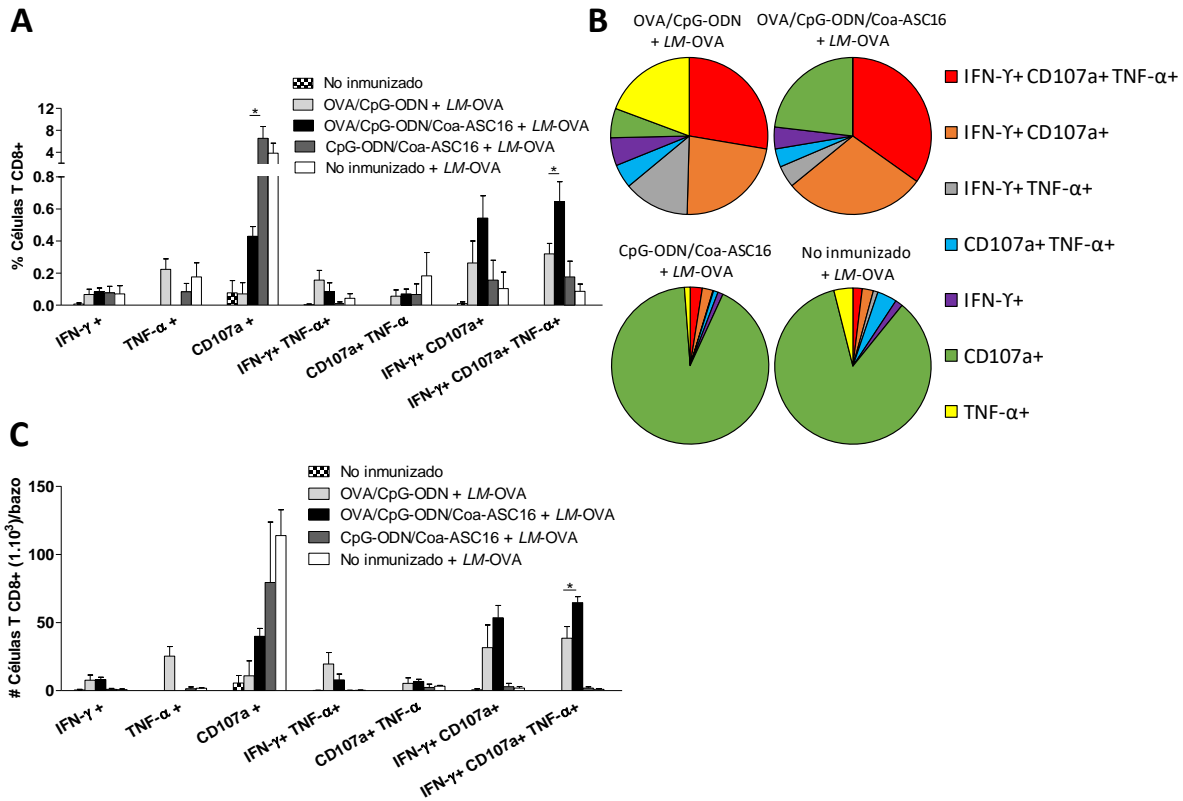


Figura 2.13. Calidad de la respuesta celular T CD8+ inducida por diferentes estrategias adyuvantes frente a una infección con LM-OVA. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0. Siete días post inmunización los animales inmunizados más un grupo control no inmunizado fueron infectados con 10^5 UFC/ratón de LM-OVA. Dos días post infección, los animales fueron sacrificados para la extracción de bazo. Análisis multiparamétrico por citometría de flujo de células T CD8+ específicas del péptido SIINFEKL. **(A)** Porcentaje de células T CD8+ productoras de cada una de las siete combinaciones posibles de las citoquinas IFN- γ y TNF- α y de la proteína CD107a dentro de la población total de células T CD8+ calculadas por el método boolean gating tras substracción de los valores de expresión basales. **(B)** Fracción de células T CD8+ productoras de las siete combinaciones posibles de citoquinas dentro de la población T CD8+ positiva para al menos una de las citoquinas estudiadas. **(C)** Número total de células T CD8+ productoras de cada una de las siete combinaciones posibles de las citoquinas IFN- γ , TNF- α y IL-2 dentro de la población total de células T CD8+ calculadas por el método boolean gating tras substracción de los valores de expresión basales. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$.

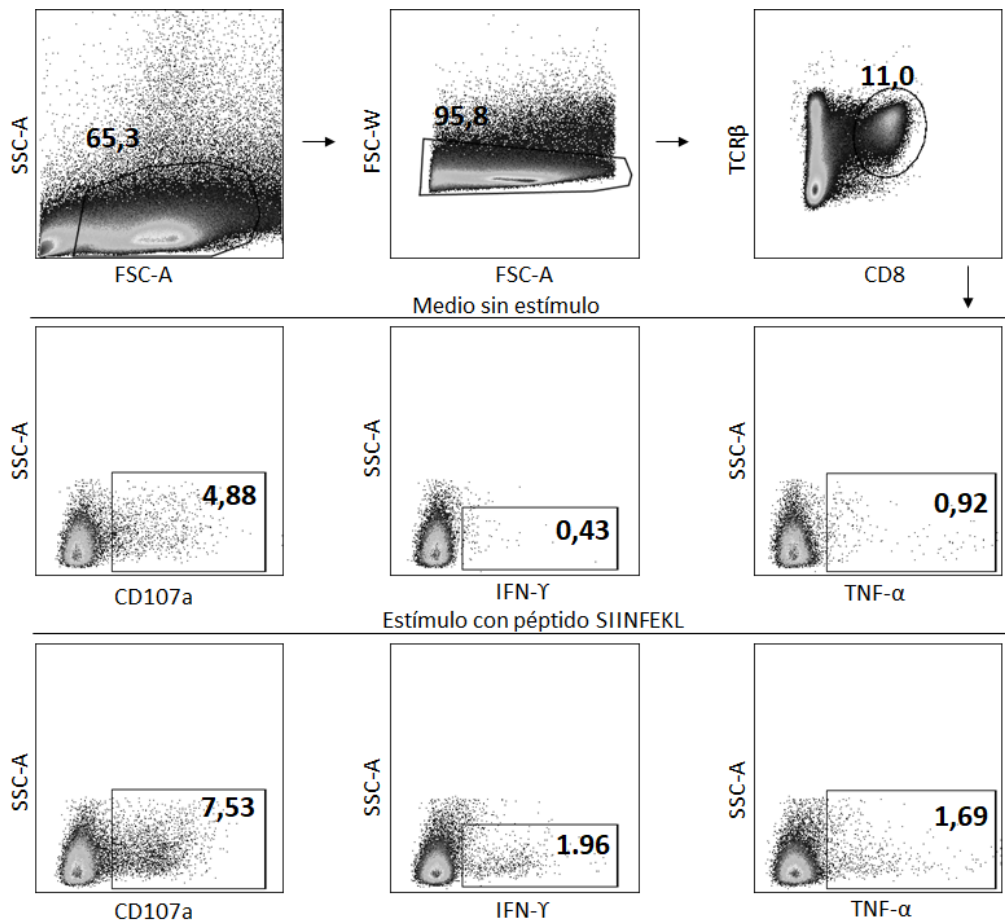


Figura 2.14. Estrategia de gating utilizada para el análisis de producción de citoquinas intracelulares y grado de desgranulación en células T CD8+ mostradas en Fig.2.13. Los dot plot son representativos de un animal inmunizado con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Los gates muestran la selección utilizada para los cálculos por medio del método boolean gating.

Finalmente, a modo de demostrar estrictamente la eficacia de esta respuesta celular T CD8+ efectora podemos observar que la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 fue capaz de disminuir la carga bacteriana en el hígado en al menos dos unidades logarítmicas en comparación con la inmunización con OVA/CpG-ODN. De esta forma, queda demostrado que la formulación del CpG-ODN con coagel es capaz de inducir una protección primaria mediada por células T CD8+ superior a las otras formulaciones.

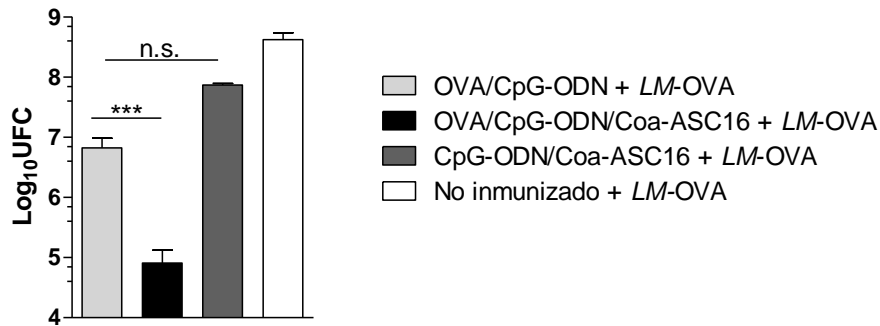


Figura 2.15. Carga bacteriana remanente en hígado en animales inmunizados con diferentes estrategias adyuvantes tras infección con LM-OVA. Animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0. Siete días post inmunización los animales inmunizados más un grupo control no inmunizado fueron infectados con 10^5 UFC/ratón de LM-OVA. Dos días post infección, los animales fueron sacrificados para la extracción del hígado. Número de UFC de LM-OVA en hígado en los distintos grupos de tratamiento expresado en unidades logarítmicas. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (3 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. *** $p < 0,001$; n.s: no significativo.

Con estos resultados, podemos concluir que la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 genera una respuesta de células T CD8+ efectora de mayor magnitud y calidad que su contraparte en solución, OVA/CpG-ODN. Asimismo, la protección mediada por células T CD8+ inducida por esta novedosa estrategia adyuvante también ha demostrado ser más eficaz ante un modelo de infección bacteriano intracelular que las demás estrategias adyuvantes resultando en una significativa reducción de colonias bacterianas en hígado.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO II

En este segundo capítulo evaluamos la capacidad de esta estrategia adyuvante de generar una respuesta celular T CD8+ efectora utilizando como modelo de estudio un antígeno proteico no particulado administrado exógenamente. La formulación del CpG-ODN con el Coa-ASC16 demostró optimizar sustancialmente la respuesta celular T CD8+ inducida por el CpG-ODN tanto en magnitud como en calidad incluso al reducir el esquema de inmunización de tres a una única dosis.

Adicionalmente, se demostró que la generación de esta respuesta celular T CD8+ efectora es independiente de la vía de señalización dada por IL-6 y de la asistencia mediada por células Th. Sin embargo, la participación de los IFN-I resultó ser absolutamente esencial para la inducción de esta respuesta.

El uso de esta formulación adyuvante también demostró promover la internalización simultánea del antígeno OVA y el CpG-ODN por medio de DCs explicando, en cierta forma, el efecto observado en el incremento de la inducción de la respuesta celular T CD8+ mediante un antígeno exógeno no particulado.

Finalmente, se comprobó la superioridad en la protección conferida por la inmunidad celular mediada por células T CD8+ inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-AS16 respecto a su contraparte en solución OVA/CpG-ODN frente a un modelo de infección con *L. monocytogenes*.

CAPÍTULO III

*Efecto adyuvante sobre la respuesta celular T CD8+ de
MEMORIA del CpG-ODN formulado en un sistema
nanoestructurado*

El objetivo primordial de toda vacuna es lograr ejercer una protección eficaz que perdure en el tiempo. La gran mayoría de las vacunas licenciadas para uso humano, como hemos descrito previamente, ejercen su protección a expensas de anticuerpos (inmunidad humoral) pero fallan a la hora de generar una respuesta celular T que perdure en el tiempo (inmunidad celular). Con el objetivo de superar este desafío, numerosos grupos se han dedicado a estudiar los mecanismos fisiológicos involucrados en la inducción de células T de memoria tras procesos infecciosos que generan naturalmente poblaciones de memoria de gran magnitud y relativamente fáciles de detectar para su estudio. Sin embargo, el estudio del comportamiento de la memoria celular inducida tras vacunación representa un desafío mayor, dado que la respuesta T generada por la mayoría de las vacunas es relativamente débil en comparación con la generada frente a un proceso infeccioso y representa complicaciones en término de su detección y análisis. Adicionalmente, la respuesta inmune de memoria se ve afectada por el número de inmunizaciones empleadas, siendo que, en numerosas ocasiones, es necesario utilizar más de una inmunización para generar una memoria eficaz. A continuación, se describirán brevemente algunos conceptos relacionados con la respuesta inmune de memoria.

Proceso fisiológico de inducción de memoria celular T CD8+

Durante una respuesta inmune típica frente a una infección aguda, un número pequeño de células T CD8+ vírgenes reconoce al invasor, se activa, prolifera y expande ampliamente para generar una población efectora capaz de controlar la infección. La mayoría de estas células (alrededor de un 95%) morirán posteriormente por apoptosis en la fase de contracción. Durante la fase de expansión también se producen las células que eventualmente formarán parte de la población de memoria que se mantendrá a largo plazo. La llamada memoria inmunológica simplemente indica que el sistema inmune, frente a exposiciones sucesivas (pero interrumpidas) en el tiempo hacia un mismo antígeno, tiene la capacidad de sufrir modificaciones cualitativas y/o cuantitativas para incrementar la efectividad protectora hacia ese antígeno. Esto conduce a una respuesta inmune secundaria mejorada en comparación con la respuesta primaria. Con el término "mejorada", nos referimos a una respuesta de mayor magnitud, más rápida, más sensible

a dosis bajas de antígeno y más eficaz que la respuesta efectora primaria (159-161) (**Fig. 3.1**)

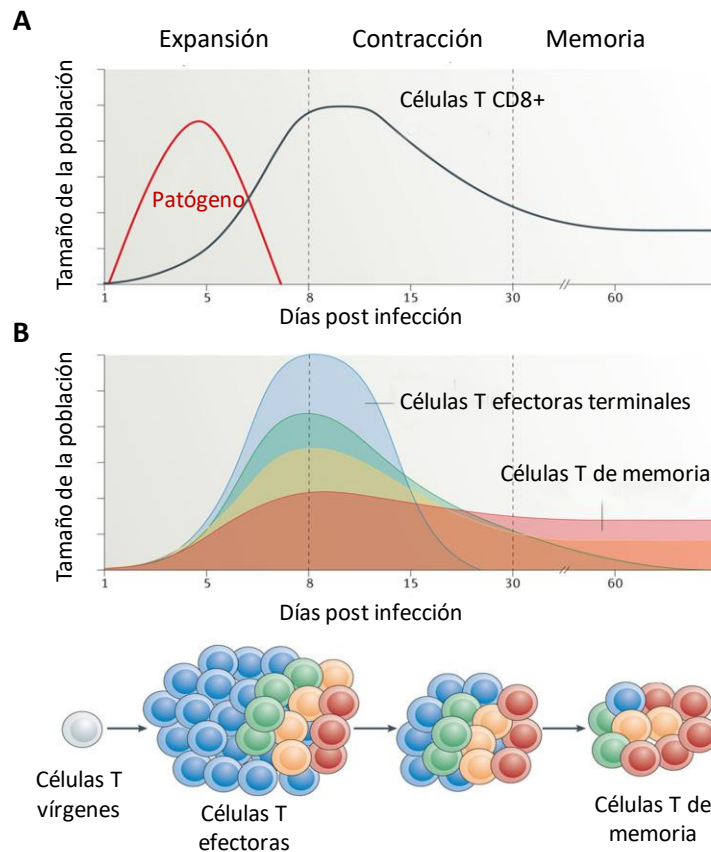


Figura 3.1. Cinética de una respuesta celular T. (A) Durante la fase de infección viral aguda, las células T específicas de antígeno proliferan rápidamente (fase de expansión) y se diferencian en linfocitos T citotóxicos que eliminan el virus. La mayoría de estas células mueren durante las próximas semanas durante la fase de contracción de la respuesta. Solo un pequeño porcentaje de células T efectoras (5-10%) sobrevive y se desarrolla para dormir la población de memoria T CD8+. **(B)** La población de células T efectoras se puede separar en múltiples subpoblaciones en función de diferencias en la expresión de genes y proteínas, función efectora, patrones migratorios, capacidad proliferativa y su destino a largo plazo. En última instancia, no todas las células T efectoras tienen el mismo potencial para formar células T de memoria. Algunos marcadores de superficie celular se correlacionan con los distintos destinos de células T efectoras y de memoria: las células T efectoras terminales, en azul, son $KLRG1^{hi}$ $IL-7R\alpha^{lo}$ $CD27^{lo}$ $BCL-2^{lo}$ mientras que las células de memoria (y precursoras de memoria), en rojo, son $KLRG1^{lo}$ $IL-7R\alpha^{hi}$ $CD27^{hi}$ $BCL-2^{hi}$. Sin embargo, también existen otras subpoblaciones de células T con estados de diferenciación intermedios que tienen fenotipos, longevidad y habilidades para autorrenovarse mixtos, como lo muestran las poblaciones amarilla y verde. Con el tiempo, también puede haber alguna interconversión entre estas subpoblaciones. *Adaptado de Kaech y col., 2012 (162).*

Definición de memoria celular y descripción de las diferentes subpoblaciones de memoria celular T

La población de células T de memoria no es una población homogénea, sino que se compone de diversas subpoblaciones de gran flexibilidad. Las células de memoria mínimamente pueden definirse como aquella población que persiste a largo plazo tras la eliminación del antígeno (mientras que las células efectoras "típicas" no lo hacen). Sin embargo, no hay consenso sobre la longevidad mínima suficiente para clasificar como "memoria", y esta definición no incluye propiedades funcionales. Un criterio adicional comúnmente usado es su alta capacidad de proliferación tras un segundo contacto con el antígeno. El uso de estos dos parámetros (longevidad y potencial proliferativo) permite la demarcación de subpoblaciones de células T vírgenes, de memoria T efectoras (T effector memory, T_{EM}) y de memoria T central (T central memory, T_{CM}). Brevemente, podemos decir que las células T_{EM} tienen generalmente una vida útil más limitada y un potencial proliferativo más débil en comparación con sus homólogos de células T_{CM} . Estudios más recientes han identificado una tercera población de células T de memoria residentes de tejido (tissue-resident memory T cells, T_{RM}) que se diferencia del resto en sus capacidades migratorias. Dichas células residen en los tejidos periféricos no linfoides y no tienen la capacidad de recircular ejerciendo una protección local rápida frente al ingreso "in situ" de patógenos (163, 164). Sin embargo, los análisis de las poblaciones tras activación en diferentes modelos de infección ilustran una diversidad mucho mayor en los potenciales de supervivencia y capacidad de respuesta, así como diversas subpoblaciones definidas por marcadores fenotípicos y funcionales en sitios linfoides y no linfoides (165, 166).

Memoria en vacunas

Para el diseño racional de vacunas más eficientes es necesario conocer principalmente dos cosas: cómo funciona el proceso de inducción de las diferentes poblaciones de memoria T y cómo correlacionan dichas poblaciones con un efecto protector frente a una infección o enfermedad.

Puntos a tener en cuenta en el diseño de vacunas:

- Asistencia por medio de células Th en el momento de inducción de la respuesta inmune “priming”: Está ampliamente descrito que la activación de células T CD8+ in vivo puede ocurrir en la ausencia de interacción con células Th (167). Sin embargo, diversos estudios demostraron que las células Th tienen un rol importante en la activación inicial (fase de expansión) y destino (fase post expansión) de células T CD8+ hacia células de memoria (168-171) tanto en modelos de infección como de inmunización. Dicho de otra manera, son requisito para la inducción y mantenimiento de memoria celular T CD8+.
- Dosis de antígeno durante el “priming”: La dosis y el tiempo de persistencia del antígeno ideal para generar memoria de buena calidad son parámetros que hasta el día de hoy desatan grandes controversias. Algunos estudios apoyan la idea de que la magnitud de la expansión primaria de las células T CD8+ correlaciona positivamente con la cantidad de antígeno administrada o dosis de infección; es decir que, a mayor dosis inicial de antígeno, mayor será la respuesta de memoria T generada (172). Sin embargo, otros estudios, contradicen estos resultados. Por ejemplo, en un modelo de infección con *L. monocytogenes*, Pope y colab. encontraron una correlación inversa entre la dosis de antígeno administrada durante el “priming” de células T CD8+ y la magnitud de la respuesta de memoria generada tras el desafío oral con el patógeno (173). Subsecuentemente, Badovinac y colab. compararon la respuesta de memoria celular T CD8+ inducida en ratones previamente inmunizados con dos dosis diferentes (alta y baja) de antígeno y observaron que la respuesta de memoria era mayor en aquellos animales inmunizados con la dosis baja de antígeno (174). Aunque este tema es aún muy controversial, mayormente está aceptado que un “priming” con dosis de antígeno persistente en el tiempo (efecto “depot”) puede generar memoria de mayor calidad (175, 176).
- Proceso inflamatorio durante el “priming”: La generación de un microambiente inflamatorio es necesario para la activación de la respuesta innata y posterior inducción de la respuesta adaptativa. Sin embargo, un proceso inflamatorio excesivo puede tener efectos negativos sobre la calidad de la respuesta de memoria inducida afectando tanto el número de clones de memoria generados como su capacidad de respuesta secundaria

(177). Otro aspecto a tener en cuenta es la composición del microambiente inflamatorio, ya que el mismo, impacta considerablemente sobre las propiedades (cantidad y calidad) de la respuesta de células T CD8+ de memoria (178-181).

Precusores de memoria

En modelos experimentales murinos en infecciones agudas con el virus de coriomeningitis linfocítica (lymphocytic choriomeningitis virus, LCMV) o *L. monocytogenes* se ha descrito que, en las primeras etapas de expansión celular, es posible distinguir tempranamente entre las células T CD8+ en expansión que darán lugar a células de memoria de aquéllas que se diferenciarán a célula efectoras. Esta distinción se da mediante la combinación de los marcadores de superficie: killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) y CD127 (receptor de IL-7, IL7 α). Algunos estudios sugieren que las células que, en etapas tempranas, expresan la combinación de altos niveles de KLRG1 y bajos niveles de CD127 (KLRG1^{hi} CD127^{lo}), tienden a diferenciarse a células efectoras y se las denomina “**células efectoras de vida media corta**” (**Short-Lived Effector Cells, SLECs**). En cambio, las células que expresan, durante la fase de expansión, bajos niveles de KLRG1 y altos niveles de CD127 (KLRG1^{lo} CD127^{hi}), tienden a diferenciarse en células de memoria y se las denomina “**células efectoras precursoras de memoria**” (**Memory Precursor Effector Cells, MPECs**) (182-185). Sin embargo, es importante aclarar que esta combinación de marcadores no son indicadores exactos de SLECs and MPECs y deben tomarse con precaución. Está descrito que no todas las células CD127^{hi} dan lugar a células de memoria. Asimismo, existen células de fenotipo KLRG1^{hi} CD127^{lo} que pueden persistir por un tiempo tras infecciones primarias y secundarias y células T CD8+ efectoras y de memoria que pueden expresar ambos marcadores KLRG1 y CD127 (182, 183). Además, los mecanismos de activación de células T durante procesos no infecciosos, por ejemplo, vacunación con DCs, pueden generar una población casi uniforme de células tipo MPECs pero muchas de estas células, no se convierten en células de memoria T CD8+ (177, 186, 187). Estos resultados sugieren que las células T CD8+ efectoras pueden residir en un rango de estados diferenciados que abarcan los estados SLEC y MPEC y, por lo tanto, es aconsejable tener en cuenta otros atributos para refinar la identidad de estos precursores celulares. Adicionalmente, aún se dispone de escasa

información sobre las poblaciones KLRG1^{lo} CD127^{lo}, denominadas “**células efectoras tempranas**” (**Early Effector Cells, EECs**) o de las poblaciones KLRG1^{hi} CD127^{hi} “**células efectoras doble positivas**” (**Double-Positive Effector Cells, DPECs**). Particularmente, las células EECs han sido investigadas en modelos de infección viral y bacteriana arrojando diferentes resultados. Sin embargo, dichos modelos llegan a la conclusión de que esta población es un estado transitorio de células precursoras que aún no han sido comprometidas a la diferenciación de SLECs o MPECs y que dicha decisión depende de estímulos inflamatorios adicionales (188).

RESULTADOS DEL CAPÍTULO III

Estudio de precursores de células T CD8+ efectoras y de memoria durante la fase de expansión inducidos tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

Teniendo en cuenta los resultados previos obtenidos sobre la expansión de células T CD8+ antígeno específicas durante la fase efectora tras inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 nos adentramos a estudiar su potencial en la generación de células T CD8+ de memoria. Como un primer acercamiento sobre el tema iniciamos analizando la posible generación de precursores tempranos de memoria. Con este objetivo, se compararon las subpoblaciones de células T CD8+ tetramero positivas inducidas tempranamente tras la inmunización con diferentes estrategias adyuvantes con aquella inducida por un modelo de infección con $\Delta ActA$ LM-OVA.

Para ello, animales C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o infectados vía i.v. con $\Delta ActA$ LM-OVA en el día 0. Siete días post tratamiento, los animales fueron sacrificados para la recolección del bazo y posterior análisis de subpoblaciones precursoras de células T CD8+ efectoras y de memoria. Inicialmente, analizamos la población de células T CD8+ tetramero positivas en porcentaje (**Fig. 3.2 A**) y número total (**Fig. 3.2 B**) inducidas por los distintos tratamientos. Posteriormente, estudiamos la frecuencia de precursores MPECs y SLECs dentro de las células T CD8+ tetramero positivas mediante el uso de la combinación de marcadores de superficie KLRG1 y CD127. Si bien las poblaciones de células tetramero positivas son muy pequeñas, nos permite observar ciertas tendencias. Los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 muestran porcentajes de MPECs y SLECs similares, con una inducción de MPECs ligeramente mayor que las observadas mediante la infección con $\Delta ActA$ LM-OVA (**Fig. 3.2 C-E**). La infección bacteriana, en cambio, induce principalmente una subpoblación de fenotipo efector con un porcentaje de células SLECs significativamente superior a las estrategias adyuvantes utilizadas (**Fig. 3.2 E**). Estos resultados son coherentes con el objetivo de una vacuna donde idealmente se busca la generación de protección a largo plazo y no se requiere, como el caso de una infección, de una respuesta efectora robusta inminente. A pesar de que ambas estrategias de inmunización generan la misma proporción de células MPECs, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 generan un número de MPECs sustancialmente superior a su contraparte soluble, OVA/CpG-ODN y a los animales

infectados con $\Delta ActA$ LM-OVA (**Fig. 3.2 F**). Este resultado es consistente con una magnitud de expansión clonal primaria superior de células T CD8+ tetrámero positivas al inmunizar con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en comparación con su contraparte OVA/CpG-ODN. En otras palabras, la formulación del CpG-ODN con el coagel no parece afectar el destino de células T CD8+ en expansión hacia células de memoria, sino que la diferencia recae en el número de clones T CD8+ activados en expansión que es superior al utilizar el coagel en la formulación. Este efecto en el aumento del número total de clones T CD8+ diferenciados a MPECs podría trasladarse a una mejor protección a largo plazo.

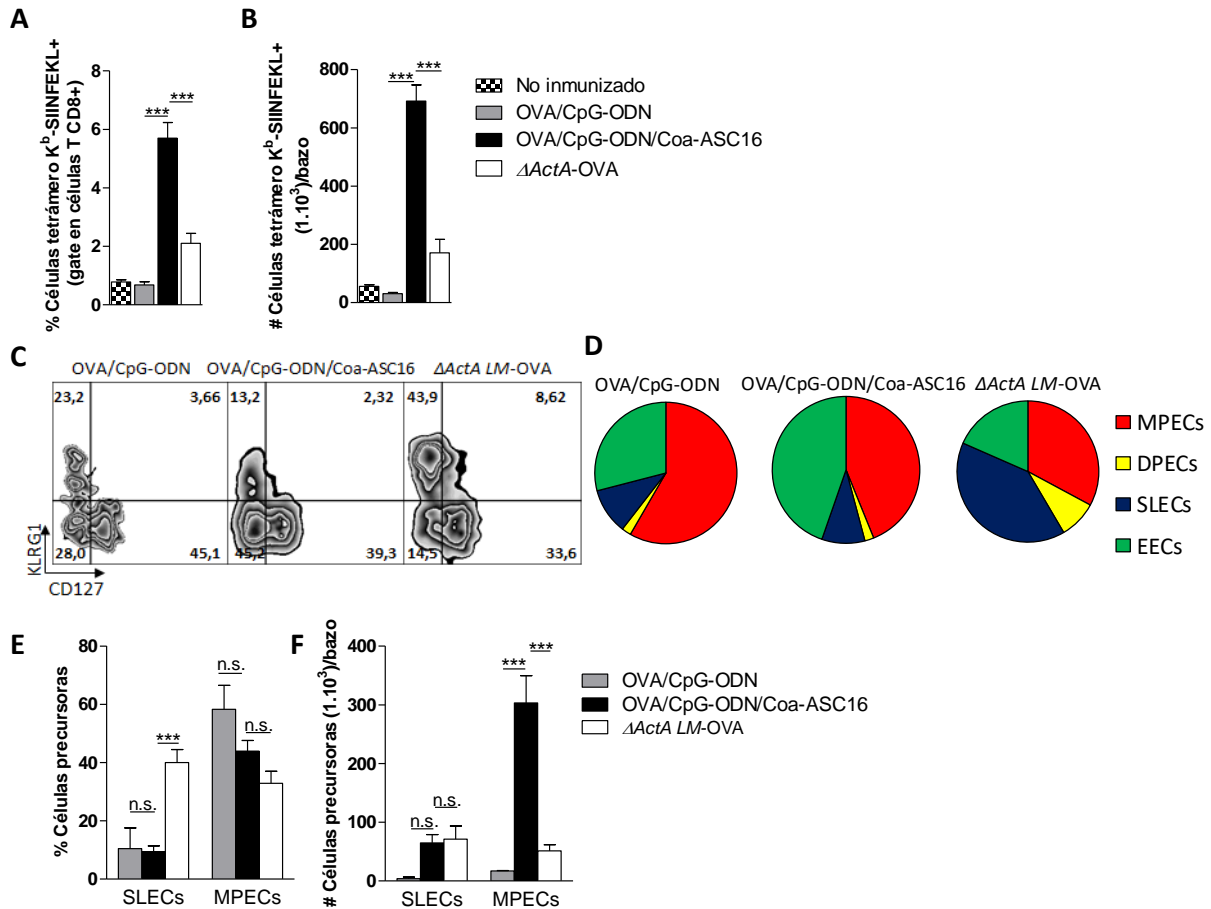


Figura 3.2. Subpoblaciones de células T CD8⁺ tetramero positivas durante la fase de expansión clonal primaria. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/CoaASC16 o infectados con 5×10^3 UFC/ratón de $\Delta ActA$ LM-OVA al día 0. Al día 7 post tratamiento, los animales fueron sacrificados para extracción del bazo. **(A)** Porcentaje y **(B)** número total de células T CD8 tetramero K^b-SIINFEKL positivas. **(C)** Zebra Plot representativos de las subpoblaciones precursoras T CD8⁺ tetramero SIINFEKL positivas de cada grupo de tratamiento. **(D)** Proporción de cada subpoblación de células precursoras T CD8⁺ tetramero SIINFEKL positivas. **(E)** Porcentaje y **(F)** número total de las subpoblaciones SLECs y MPECs inducidas en los distintos grupos de tratamiento dentro del gate de células T CD8⁺ tetramero K^b-SIINFEKL positivas. **(E)** Los datos representan la media \pm SEM de los valores individuales (4 ratones/tratamiento en cada experimento) de dos experimentos independientes. *** $p < 0,001$; n.s.: no significativo.

Cinética en sangre de la expansión y contracción primaria y expansión secundaria de células T CD8+ tetrámero positivas. Establecimiento del periodo correspondiente a la fase memoria

Típicamente, tras el reconocimiento de un antígeno y posterior activación de los linfocitos T CD8+ vírgenes, esos clones específicos de antígeno entran en un estado de expansión para incrementar la población efectora e inducir una respuesta efectiva contra el antígeno. Comúnmente, la fase de expansión clonal llega a su pico entre los días 5 y 7 post encuentro con el antígeno. Luego, esas células entran en un estado de contracción donde se estima que aproximadamente el 95% de los clones mueren por apoptosis. Cerca del 5% restante, se diferenciará para dar células de memoria T CD8+ específicas de antígeno.

Con el fin de estudiar los clones de células T CD8+ de memoria inducidos por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 era necesario primero establecer en nuestro modelo el periodo a partir del cual era correcto hablar de memoria celular. Para ello, realizamos una cinética en sangre de células T CD8+ tetrámero positivas en animales inmunizados en el día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o CpG-ODN/Coa-ASC16. El primer objetivo de esta cinética fue evaluar la respuesta T CD8+ primaria inducida tras las distintas estrategias de inmunización. Una vez observada la contracción primaria de las células T CD8+ específicas del péptido SIINFEKL hasta un nivel indetectable por medio de la marcación con el tetrámero K^b-SIINFEKL, se esperó alrededor de 20 días para asegurar la estabilidad de los clones de memoria. Al día 34 post inmunización los animales inmunizados fueron infectados con 1x10⁶ UFC/ratón de *ΔActA LM-OVA* con el objetivo de proporcionar un segundo encuentro con el antígeno para expandir los clones de memoria y determinar su tiempo de reacción (expansión secundaria). Adicionalmente, se infectó un grupo no inmunizado como control. Como podemos observar, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 inducen una respuesta celular efectora T CD8+ detectable en sangre por medio del tetrámero K^b-SIINFEKL que llega a su pico al día 7 post inmunización mientras que los demás grupos de tratamiento prácticamente no logran una expansión primaria detectable por tetrámero (**Fig. 3.3 A y B**). Entre los días 3 y 5 post infección con *ΔActA LM-OVA* podemos observar la rápida expansión secundaria de células T CD8+ de memoria

tetrámero positivas correspondiente a los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (**Fig. 3.3 A**). A pesar de la amplia expansión de los clones de memoria correspondientes a dichos grupos de tratamiento, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentan un porcentaje significativamente mayor a la de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. Como es de esperar, los grupos control (animales infectados sin previa inmunización) o inmunizados con el adyuvante en ausencia de antígeno (CpG-ODN/Coa-ASC16) respondieron en forma similar ante la infección generando una respuesta primaria hacia el antígeno con una expansión clonal máxima a los días 7 post infección. Con estos resultados podemos afirmar que entre los días 3 y 5 (**Fig. 3.3 C, día 37 y día 39**) post infección las células T CD8+ tetrámero positivas corresponden estrictamente a clones de memoria en expansión. Más allá de este periodo, comienzan a mezclarse células T CD8+ primarias y secundarias en respuesta a la infección con $\Delta ActA$ LM-OVA.

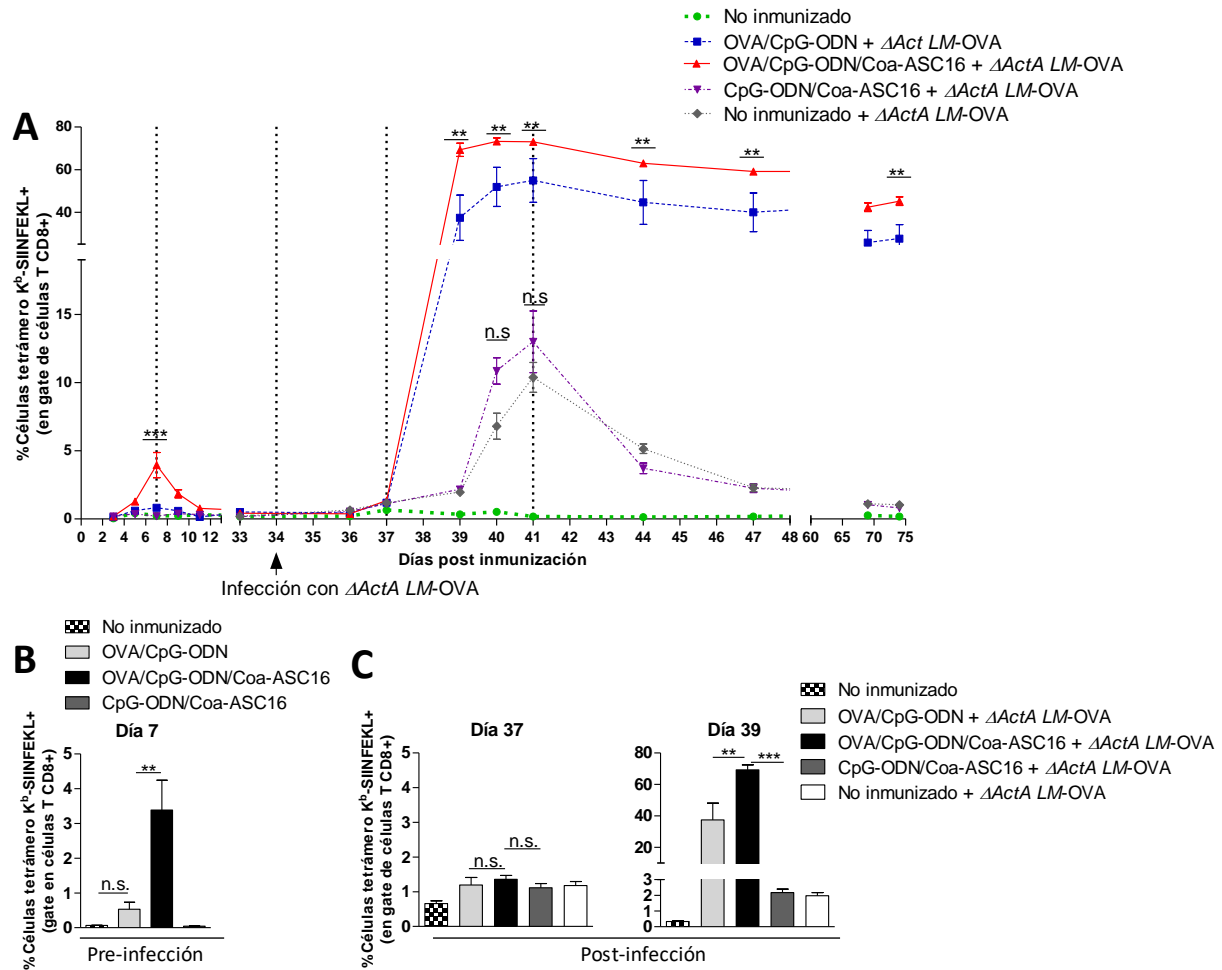


Figura 3.3. Cinética en sangre de expansión y contracción primaria y expansión secundaria de células T CD8⁺ tetrámero positivas. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados en el día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 34 post inmunización, los animales inmunizados y un grupo control sin tratar fueron infectados vía i.v. con 10⁶ UFC de $\Delta ActA$ LM-OVA/ratón. Los animales fueron sangrados a distintos días durante un periodo de 2,5 meses para la medición de células tetrámero K^b-SIINFEKL positivas dentro del gate de células T CD8⁺. **(A)** Cinética del porcentaje de células T CD8⁺ tetrámero K^b-SIINFEKL positivas en sangre. Los asteriscos representan la diferencia estadística entre los grupos de inmunización OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16; las referencias n.s. se refieren a la comparación entre los grupos de tratamiento CpG-ODN/Coa-ASC16 y no inmunizado + $\Delta ActA$ LM-OVA. **(B)** Porcentaje en sangre de células T CD8⁺ tetrámero K^b-SIINFEKL positivas al día 7 post inmunización. **(C)** Porcentaje en sangre de células T CD8⁺ tetrámero K^b-SIINFEKL positivas al día 3 (día 37 post inmunización) y 5 (día 39 post inmunización) post infección con $\Delta ActA$ LM-OVA. Los datos representan la media \pm SEM de los valores individuales (4 ratones/ tratamiento en cada experimento) de dos experimentos independientes. **p<0,01; ***p<0,001; n.s.: no significativo.

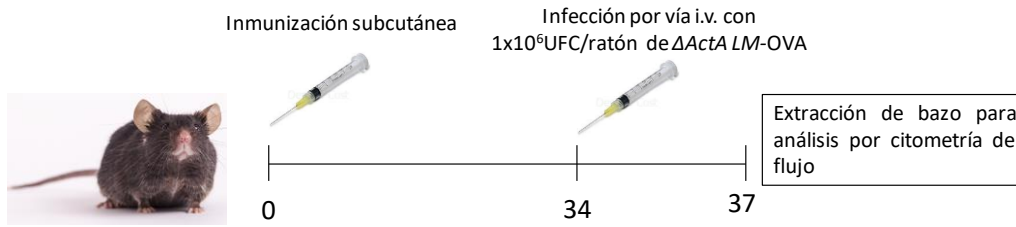
Caracterización de la respuesta celular T CD8+ de memoria inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16

Una vez establecido el periodo en el cual transcurre la fase de memoria celular T CD8+ nos propusimos estudiar la magnitud y calidad de dicha respuesta inducida por el CpG-ODN formulado en la nanoestructura en comparación con el CpG-ODN en solución.

Dado que la magnitud de la respuesta endógena de células T CD8+ inducida por una vacuna es muy baja, para estudiar la respuesta T en la fase de memoria utilizamos una infección con $\Delta ActA$ LM-OVA a modo de provocar un segundo encuentro con el antígeno y expandir los clones de memoria hacia un nivel detectable por tetrámeros K^b-SIINFEKL. Para ello, ratones C57BL/6 fueron inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o CpG-ODN/Coa-ASC16 en el día 0. Treinta y cuatro días post inmunización, durante la fase memoria, los animales inmunizados y un grupo control fueron infectados vía i.v. con 1×10^6 UFC/ratón de $\Delta ActA$ LM-OVA. Tres días post infección, los animales fueron sacrificados para el estudio de células T CD8+ de memoria en bazo (**Fig. 3.4 A**). Los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentaron un porcentaje de células T CD8+ tetrámero positivas alrededor de dos veces mayor que los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. A ese tiempo, la frecuencia de células T CD8+ tetrámero positivas de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN no muestra diferencias significativas con el grupo control no inmunizado. A modo de control, podemos observar que los animales inmunizados con el adyuvante sin el antígeno (CpG-ODN/Coa-ASC16) y el grupo control (no inmunizado) generaron una respuesta de células T CD8+ apenas detectable en el periodo de tiempo estudiado corroborando que lo que observamos es una respuesta de memoria y no una respuesta primaria (**Fig. 3.4 B**). Denotando un comportamiento similar, el número total de células T CD8+ tetrámero positivas inducido por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 tras desafío con $\Delta ActA$ LM-OVA fue aproximadamente 6 veces mayor que el número generado en los animales previamente inmunizados con OVA/CpG-ODN (**Fig. 3.4 C**). En la **Fig. 3.5** se muestra la estrategia de gating utilizada.

A

Modelo experimental utilizado



Grupos de inmunización:

- OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16
- OVA/CpG-ODN
- CpG-ODN/Coa-ASC16

Grupos infectados:

- OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16
- OVA/CpG-ODN
- CpG-ODN/Coa-AS16
- No inmunizado (Control)

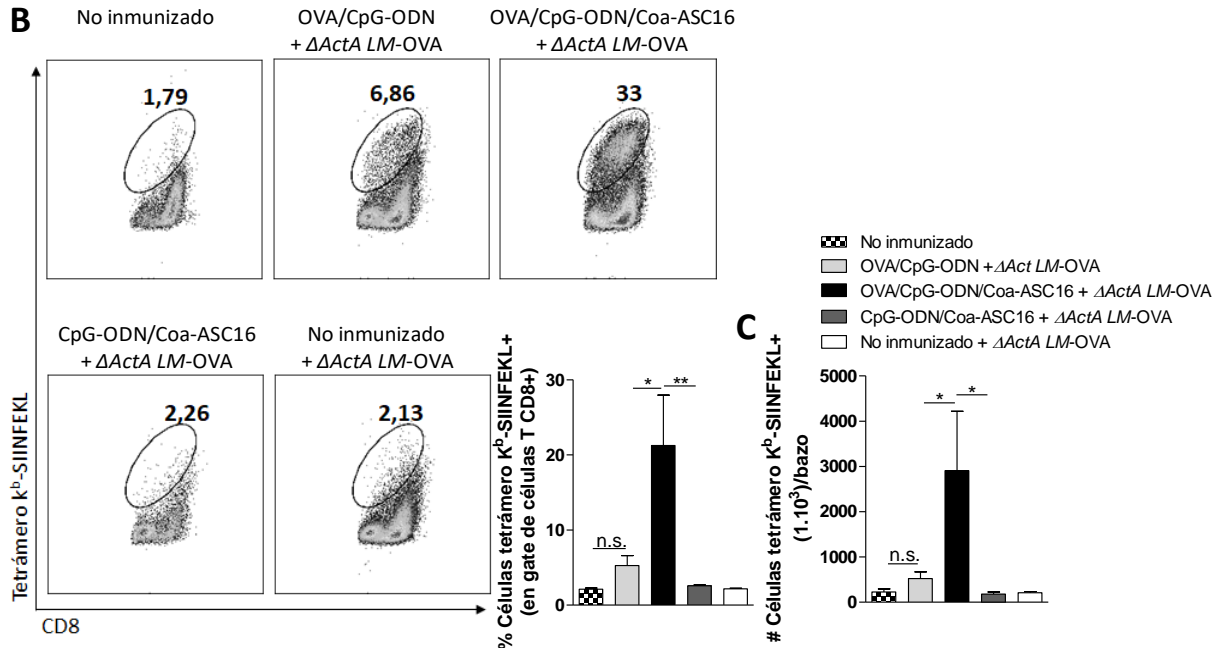
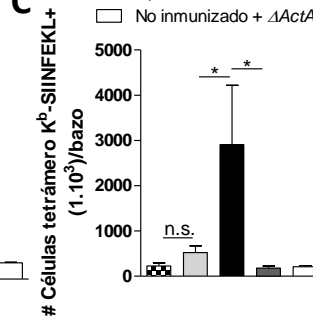
B**C**

Figura 3.4. Magnitud de la expansión secundaria de células T CD8+ de memoria inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 tras la infección con $\Delta ActA$ LM-OVA. (A) Ratones C57BL/6 fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 34 post inmunización los animales tratados y un grupo control no inmunizado fueron infectados con 10^6 de UFC/ratón $\Delta ActA$ LM-OVA. Tres días post infección, los animales fueron sacrificados para extracción del bazo. **(B)** Porcentaje y **(C)** número total de células T CD8+ tetrámero positivas en bazo al día 3 post infección con $\Delta ActA$ LM-OVA. Los dot plot en **(B)** son representativos de un animal correspondiente a cada grupo de tratamiento. Los datos representan la media \pm SEM de los valores individuales (4 ratones/ tratamiento en cada experimento) de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; n.s.: no significativo.

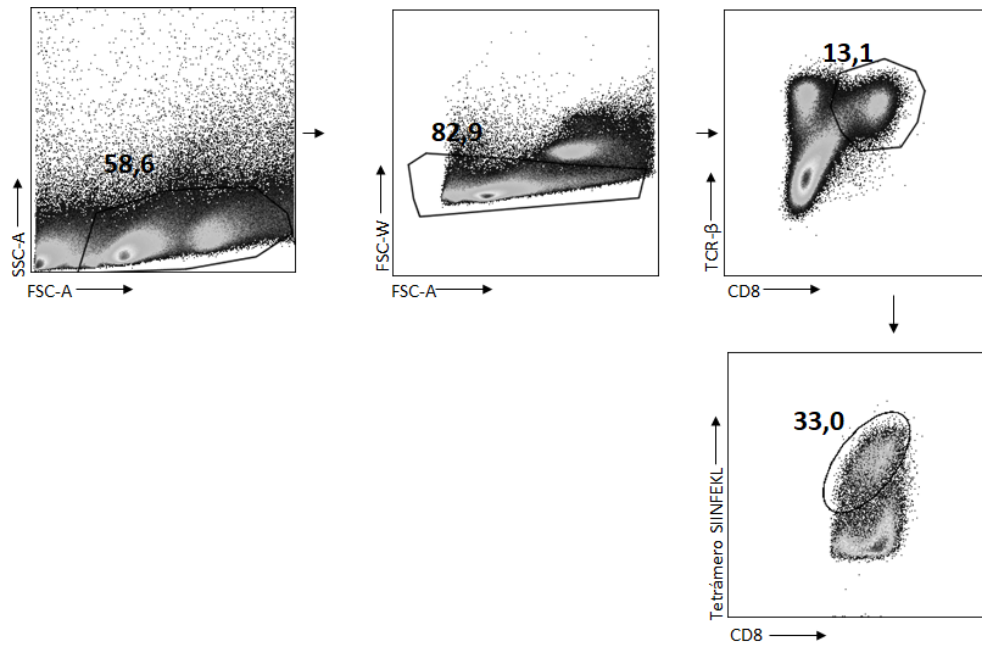


Figura 3.5. Estrategia de gating utilizada para el análisis de células T CD8+ tetramero K^b-SIINFEKL positivas mostradas en la Fig. 3.3. Los dot plot corresponden a un animal inmunizado con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16.

Adicionalmente, con el objetivo de evaluar la calidad de la respuesta de memoria secundaria de células T CD8+ observada previamente, estudiamos la frecuencia de células T CD8+ de memoria productoras de las citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-2. Los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron una mayor porcentaje (**Fig. 3.6 A**) y número total (**Fig. 3.6 C**) de células T CD8+ de memoria simple (IFN- γ +) y doble (TNF- α + IFN- γ +) positivas. Estos resultados sugieren que estas células T CD8+ tienen un mayor potencial efector que aquellas generadas por la inmunización con OVA/CpG-ODN. Los patrones de expresión de citoquinas observados entre los diferentes grupos de tratamiento muestran la similitud entre los animales que fueron previamente inmunizados con el antígeno (OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16) y los que no (CpG-ODN/Coa-ASC16 y no inmunizados) exponiendo la diferencia entre una respuesta celular T CD8+ frente al antígeno primaria de una secundaria (**Fig. 3.6 B**). En la **Fig. 3.7** se muestra la estrategia de gating utilizada.

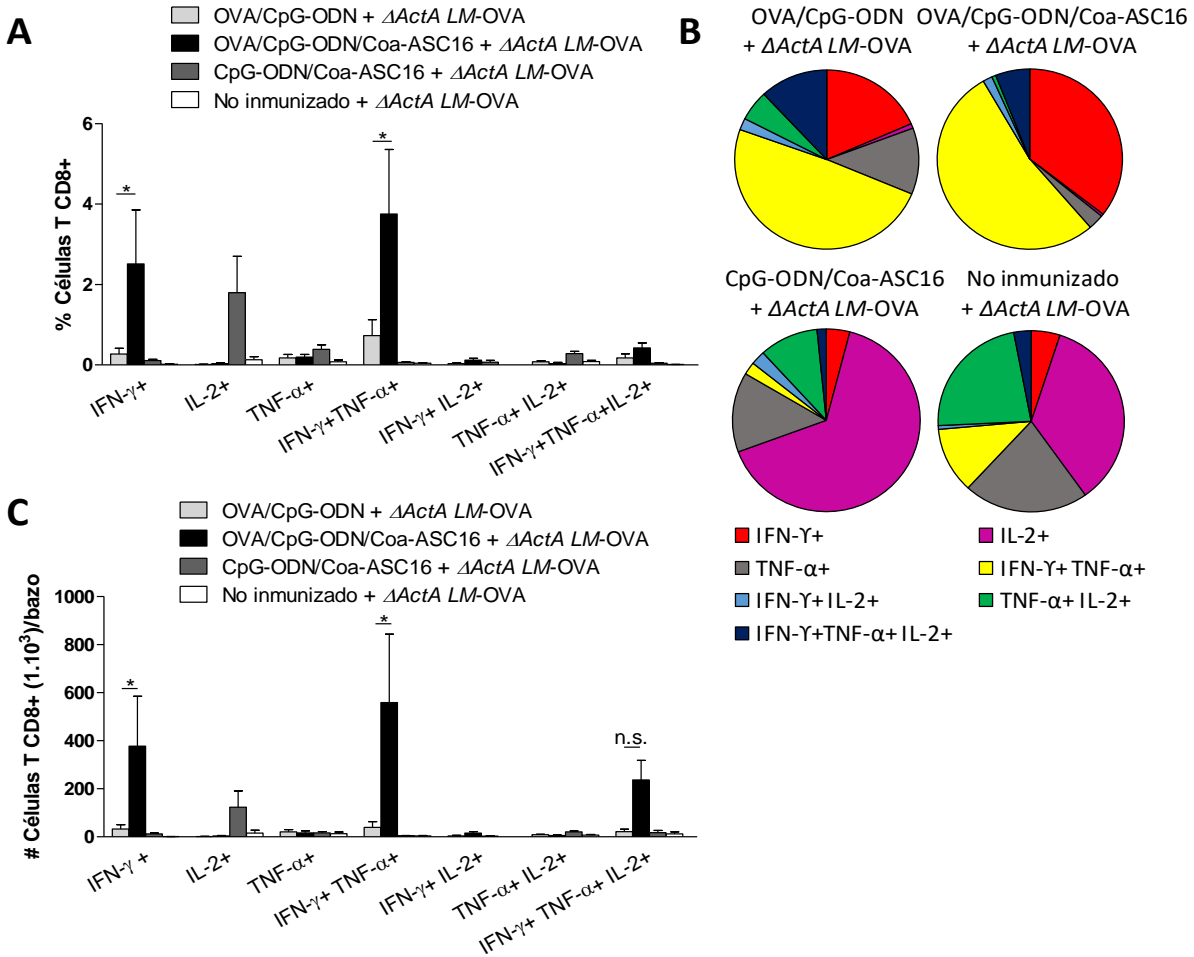


Figura 3.6. Calidad de la respuesta celular T CD8+ de memoria inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 34 post inmunización los animales tratados y un grupo control no inmunizado fueron infectados via i.v. con 1×10^6 UFC/ratón de $\Delta ActA$ LM-OVA. Tres días post infección, los animales fueron sacrificados para extracción del bazo. Las suspensiones celulares de esplenocitos fueron reestimuladas ex vivo con el péptido SIINFEKL por 5 hs. **(A)** Porcentaje de células T CD8+ productoras de cada una de las siete combinaciones posibles de las citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 dentro de la población total de células T CD8+ calculadas por el método boolean gating tras substracción de los valores de expresión basales. **(B)** Fracción de células T CD8+ productoras de las siete combinaciones posibles de citoquinas dentro de la población T CD8+ positiva para al menos una de las citoquinas estudiadas. **(C)** Número total de células T CD8+ productoras de cada una de las siete combinaciones posibles de las citoquinas IFN- γ , TNF- α e IL-2 dentro de la población total de células T CD8+ calculadas por el método boolean gating tras substracción de los valores de expresión basales. Los datos muestran la media \pm SEM de valores individuales (4 ratones por grupo de tratamiento en cada experimento) y son representativos de dos experimentos independientes. * $p < 0,05$; n.s.: no significativo.

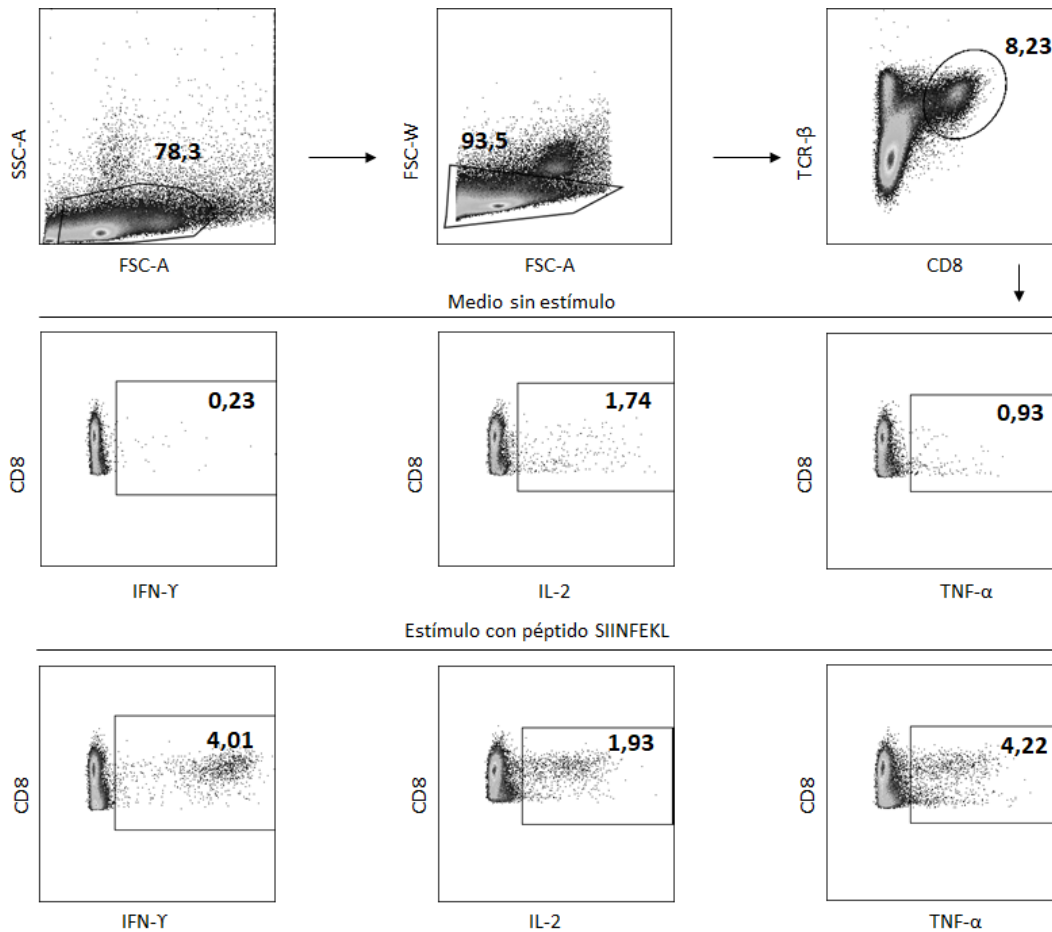


Figura 3.7. Estrategia de gating utilizada para el análisis de producción de citoquinas intracelulares por células T CD8+ mostradas en la Fig. 3.6. Los dot plot son representativos de un animal inmunizado con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Los gates muestran la selección utilizada para los cálculos por medio del método boolean gating.

Determinación de la eficiencia de la respuesta de memoria celular T CD8+ generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 frente a un modelo de infección con LM-OVA

Finalmente, evaluamos la eficiencia de la respuesta mediada por células T CD8+ de memoria inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en un modelo de infección. Para ello, ratones C57BL/6 fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16. Treinta días post inmunización, durante la fase de memoria, los animales inmunizados fueron infectados junto con un grupo control con 5000 UFC/ratón de LM-OVA. Cinco días después, los animales fueron

sacrificados para la recolección de bazo e hígado. Los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 generaron un porcentaje (**Fig. 3.8 A**) y un número total (**Fig. 3.8 B**) de células T CD8+ tetrámero positivas de memoria activadas significativamente superior a la de los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. Adicionalmente, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mostraron una mayor eficiencia en la reducción de la carga bacteriana de *LM-OVA* en hígado resultando en una reducción de más de dos unidades logarítmicas en comparación con los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN (**Fig. 3.8 C**).

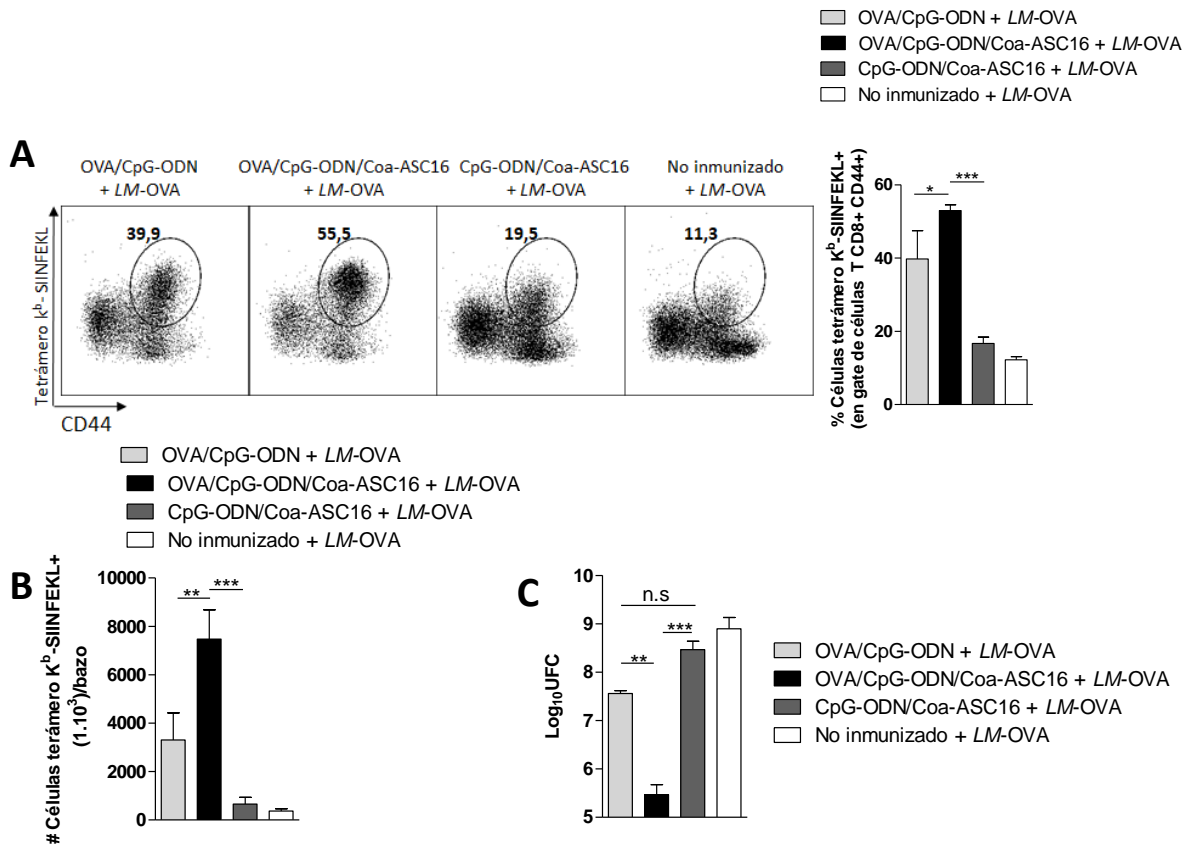


Figura 3.8. Eficacia de la respuesta celular T CD8+ de memoria inducida por inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 frente a un modelo de infección con LM-OVA. Ratones C57BL/6 fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 30 post inmunización, los animales tratados fueron infectados vía i.v. con una dosis letal de 5.000 UFC/ratón de LM-OVA. Los animales fueron sacrificados cinco días post infección para la recolección de bazo e hígado. **(A)** Porcentaje y **(B)** número total de células T CD8+ tetramero K^b-SIINFEKL+ activadas en bazo. **(C)** Carga bacteriana en hígado representada como log₁₀ UFC. Los datos representan la media ± SEM de los valores individuales (3 ratones/ tratamiento en cada experimento) de dos experimentos independientes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Con el objetivo de evaluar estrictamente el nivel de protección a largo plazo mediada por células T CD8+ se realizó un ensayo de sobrevida en donde los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16 fueron desafiados 30 días post inmunización con una dosis letal de LM-OVA. El grupo inmunizado con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 logró generar una protección eficaz contra

la infección resultando en una sobrevida del 100% mientras que los demás grupos de inmunización no lograron proteger contra la infección **(Fig. 3.9)**.

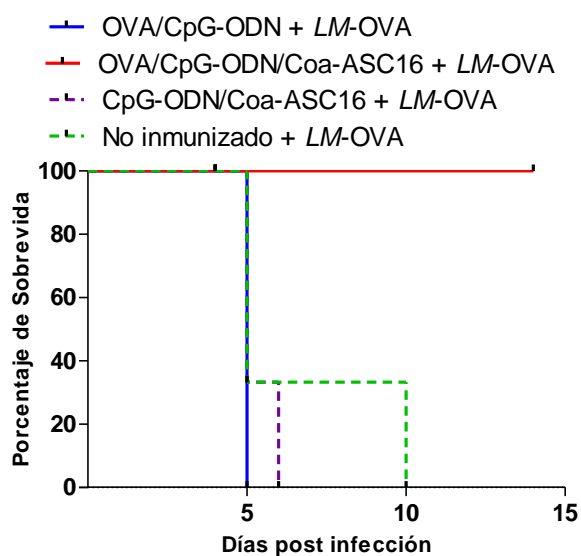


Figura 3.9. Ensayo de sobrevida frente a una infección con LM-OVA en fase de memoria. Animales C57BL/6 fueron inmunizados al día 0 con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 u CpG-ODN/Coa-ASC16. Al día 30 post inmunización, los animales tratados fueron infectados con una dosis letal de 1×10^4 UFC/ratón de LM-OVA junto a un grupo control no inmunizado. Curvas de sobrevida representado como gráfico de Kaplan-Meier para cada grupo de tratamiento (n=3). Dado el número reducido de animales el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre los grupos. (Aclaración: este experimento fue realizado en EE.UU. en el marco de una beca obtenida por el programa BECAR y lamentablemente no se llegó a repetir antes de que finalizara la beca. Fue presentado en esta tesis a pesar del número bajo de animales por haber demostrado ser muy contundente. Sin embargo, estamos en este momento poniendo a punto el sistema para repetirlo en Argentina).

Estos resultados demuestran que la formulación del CpG-ODN en el coagel induce la generación de una respuesta celular T CD8+ de memoria de mayor magnitud y calidad que su contraparte en solución probando ser más eficiente a la hora de proteger frente a una infección intracelular.

CONCLUSIONES DEL CAPÍTULO III

Con estos resultados podemos concluir que la formulación del CpG-ODN utilizando la nanoestructura de coagel como plataforma no sólo potencia el efecto adyuvante innato del CpG-ODN hacia un perfil de respuesta celular T CD8+ efectora, sino que también logra generar una respuesta celular T CD8+ de memoria superior en calidad y magnitud al CpG-ODN en solución. Dicha respuesta, demostró ser más eficaz frente a un modelo de infección intracelular contra *L. monocytogenes* protegiendo incluso frente a una dosis letal.

Sin embargo, este trabajo abarca sólo el inicio en el estudio de memoria T inducida por la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Es necesario continuar dilucidando los posibles mecanismos involucrados en la potenciación de esta respuesta, así como la caracterización de las distintas subpoblaciones de memoria T CD8+ generadas.

Discusión

La necesidad de optimizar la efectividad de las vacunas reduciendo al mismo tiempo su toxicidad ha motivado numerosos estudios sobre nuevas formulaciones para controlar cómo, cuándo y dónde los antígenos y adyuvantes encuentran células inmunes e incluso interaccionan con células no inmunes luego de su administración. En términos generales, se acepta el concepto de que los componentes de una vacuna a subunidad eficaz debe dirigirse a los LNs, activar tanto el sistema inmune innato como adaptativo, y persistir durante un tiempo suficiente para promover una respuesta inmune madura (4). El uso de formulaciones diseñadas para regular la biodistribución de adyuvantes y antígenos hacia órganos linfoides y promoción de la internalización antigénica por APCs en simultáneo con la generación de señales inflamatorias ha adquirido vital importancia en el desarrollo de vacunas de la nueva generación (4).

El CpG-ODN ha demostrado fehacientemente ser un candidato ideal como adyuvante principalmente por su gran potencial para inducir tanto una respuesta humoral como celular en un perfil de polarización Th1 (38, 98). Es por ello que ha sido considerado como componente principal en infinitas estrategias adyuvantes diseñadas con el objetivo de superar sus falencias y potenciar su efecto inmunoestimulador sobre el sistema inmune (52, 96-98). Hasta la fecha, el CpG-ODN ha sido utilizado en más de 600 estudios preclínicos y en 100 ensayos clínicos para el tratamiento o prevención de cáncer, infecciones y alergias (96). La gran mayoría de dichos estudios se han desarrollado utilizando CpG-B mientras que el CpG-A dificultosamente ha llegado sólo a unos escasos ensayos clínicos. Esto se debe a que la estructura del CpG-A permite la formación espontánea (no controlable) de estructuras ordenadas no uniformes en condiciones fisiológicas cuyas acciones biológicas son poco predecibles para su uso clínico (96). A pesar de las enormes ventajas del CpG-ODN como adyuvante, la gran mayoría de las estrategias actualmente en desarrollo para su formulación, (independientemente de la clase de CpG-ODN utilizada), son altamente costosas y difíciles de fabricar por lo que se requiere de sistemas más simples y económicamente más accesibles capaces de ser fabricados a gran escala (96).

En este trabajo proponemos una innovadora estrategia de formulación para el CpG-ODN basada en el uso de una plataforma de cristal líquido formada por autoensamblaje de palmitato de ascorbilo con el objeto de potenciar su efecto

adyuvante. Entre otras ventajas, esta nanoestructura es: simple de fabricar, estable a temperatura ambiente, está compuesta por componentes biodegradables y es fisiológicamente bien tolerado en ratones (108). Aquí, profundizamos sobre la caracterización biológica del potencial de la estrategia adyuvante propuesta iniciada años atrás por este grupo de investigación.

Previamente, se ha demostrado su capacidad para potenciar la respuesta humoral en ratones BALB/c con un modelo de tres inmunizaciones (108). Aquí, iniciamos profundizando en el estudio de los efectos de esta estrategia adyuvante en la magnitud y calidad de la respuesta humoral generada con distintos esquemas de inmunización en ratones C57BL/6.

Vale aclarar desde un inicio que la comparación de la respuesta inmune humoral y celular generada por la estrategia propuesta en este trabajo con otras formulaciones adyuvantes reportadas debe tomarse con precaución. Esto se debe a que existen multitud de factores que son propios de cada modelo experimental como la cepa de ratón empleada, el origen/calidad (grado de contaminación con endotoxinas) de la OVA, diferencia de dosis de OVA y/o CpG-ODN utilizadas y la vía de administración, entre otros. Todas estas variables influyen en la respuesta inmune generada y deben tenerse en cuenta a la hora de comparar resultados.

Como pudimos observar, la formulación del CpG-ODN con Coa-ASC16 potencia su efecto adyuvante sobre la respuesta humoral incrementando sustancialmente la magnitud de anticuerpos IgG total y subtipos IgG1 e IgG2c específicos de OVA en comparación con su contraparte en solución OVA/CpG-ODN (**Fig. 1.1**). Adicionalmente destacamos que, si bien el coagel en ausencia del CpG-ODN genera títulos de IgG e IgG1 similares a la inmunización con OVA/CpG-ODN en solución, es necesaria la presencia del CpG-ODN para inducir la generación de anticuerpos IgG2c (isotipo asociado a un perfil de respuesta Th1) demostrando su rol esencial para polarizar la respuesta hacia dicho perfil. Los resultados obtenidos con nuestra estrategia de formulación son comparables con otras formulaciones en desarrollo que involucran métodos más complejos. Por ejemplo, un trabajo de Qian Wang, que estudia la respuesta humoral inducida por OVA/CpG-ODN formulado en micropartículas de un polímero biodegradable de ácido poli(láctico-co-glicólico) conocido comúnmente por sus siglas

en inglés como PLGA, obtiene títulos de IgG1 e IgG2c comparables a los obtenidos con nuestra formulación (189). Es de destacar que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 permite la generación de ambos subtipos de IgG demostrando un potencial en la generación del tan buscado balance entre ambos perfiles de respuesta Th1/Th2.

Sin embargo, la generación de altos títulos de anticuerpos no necesariamente se correlaciona con una mayor protección humoral, en muchos casos, una activación ineficiente de linfocitos B lleva a una diferenciación de células plasmáticas productoras de anticuerpos de baja afinidad/avidez que ejercen una protección deficiente frente al patógeno contra el que se quiere proteger. Nuestros estudios demuestran que el uso del coagel para formular OVA/CpG-ODN induce anticuerpos de una avidez comparable a la inducida por el poderoso adyuvante CFA y significativamente superior a la generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN (**Fig. 1.2**). Este aumento en la calidad de los anticuerpos generados sugiere que el uso del coagel como plataforma del CpG-ODN induce señales y/o activación de células que finalmente tienen un efecto positivo sobre los CG en los órganos linfáticos secundarios promoviendo un incremento en la hipermutación somática. No obstante, este tema requiere mayor estudio para llegar a conclusiones más certeras.

Entre las diversas citoquinas involucradas en la inducción de una respuesta humoral no podemos dejar de mencionar a la IL-6. Su participación en la magnitud y calidad de este tipo de respuesta ha sido ampliamente descrita por diversos grupos de investigación. Entre otras cosas, la IL-6 induce la diferenciación de células T CD4+ a células T helper foliculares (T follicular helper cells, Tfh) quienes participan luego en el desarrollo de los CG. No obstante, existen diversas controversias en los resultados obtenidos in vivo en diferentes modelos experimentales. Cuando la IL-6 ha sido coadministrada con una vacuna a DNA como componente adyuvante ha dado resultados positivos incrementando los títulos de anticuerpos (IgG, IgG1 e IgG2a) específicos de antígeno (190). Otras publicaciones muestran que ratones *Il-6*^{-/-} inmunizados con antígenos proteicos conjugados con haptenos precipitados en aluminio, como 2,4-dinitrofenol-OVA (DNP-OVA) o 4-hidroxi-3-nitrofenil-acetil-gamma globulina de pollo (NP-CGG) junto con *Bordetella pertussis* inactivada por calor, desarrollan menores títulos de anticuerpos IgG2a e IgG total respectivamente (125,

126). Más recientemente, un elegante trabajo muestra en un modelo de ratones humanizados que la producción de IL-6 humana mejora los títulos de IgG específicos de antígeno y la frecuencia de hipermutación somática cuando estos ratones son inmunizados con OVA/CFA (191). En relación al CpG-ODN, Chakarov y colab. mostraron que la adición de este inmunoestimulante a la emulsión incompleta de Freud (IFA) mejora notablemente los títulos de IgG específica de antígeno de manera dependiente de IL-6 producida por DCs derivadas de monocitos (192).

Considerando los altos niveles de IL-6 que son liberados localmente en respuesta a la administración del coagel (109), hipotetizamos que esta citoquina podría tener un rol en la respuesta humoral desarrollada por nuestra estrategia adyuvante. Sorprendentemente, el efecto potenciador sobre la magnitud de la respuesta humoral tanto de IgG1 como de IgG2c inducida por la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 no se vio afectado por la ausencia de IL-6 (**Fig. 1.3**). Por lo tanto, en nuestro sistema, la IL-6 no parece afectar ni el efecto potenciador ni el proceso de cambio de isotipo inducidos por la formulación. En línea con nuestros resultados y a pesar de que está ampliamente aceptado que la IL-6 participa en la diferenciación temprana de las células Tfh y posterior producción de IL-21 (citoquina involucrada en la diferenciación terminal de linfocitos B en los CG), existen trabajos que indican que el desarrollo de las células Tfh es independiente de dicha citoquina (193, 194). Poholek y colab. mostraron que cuando a ratones previamente inmunizados con OVA/aluminio se les trasfiere células OT-II, (células T CD4+ con un TCR específico para el péptido de OVA), la diferenciación a células Tfh es independiente de IL-6 (193). Además, Karnowski y colab. mostraron que en un modelo de infección viral aguda en ratones *Il-6*^{-/-} la diferenciación de células T CD4+ a célula Tfh no se ve afectada (194). A pesar de que muchas publicaciones apoyan el concepto de que la IL-6 está implicada en la diferenciación temprana de las células Tfh, también ha sido demostrado que su ausencia puede ser compensada por otras citoquinas como IL-21 e IL-27 (128). Otro dato interesante, es el observado en un modelo murino de infección con LCMV, donde se describe que la ausencia de IL-6 no influye en la generación de IgG antígeno-específica en etapas tardías, pero sí en etapas tempranas, afectando la velocidad de la seroconversión (193). Dado que nuestros estudios en ratones *Il-6*^{-/-} fueron realizados al día 7 post tercera

inmunización, es posible que existan mecanismos de compensación por la deficiencia en IL-6 que estén actuando tempranamente y esta sea la razón por la cual no vemos diferencias en nuestros resultados. Además, hasta el momento, no hemos estudiado otros aspectos relacionados como la velocidad de seroconversión o el grado de avidéz de dichos anticuerpos generados en ausencia de IL-6. Por lo tanto, no es prudente descartar la posibilidad de que al menos parte del potencial de esta estrategia adyuvante en la inducción de una respuesta humoral más eficiente esté ligado a dicha interleuquina. Por otro lado, hemos demostrado indirectamente, mediante el uso de ratones *Ifna1*^{-/-}, que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce la producción de IFN-I. Ha sido descrito que la producción de IFN-I incrementa la producción de anticuerpos tanto contra infecciones virales como contra antígenos proteicos (195, 196). Le Bon y colab. demostraron que los IFN-I potencian fuertemente la respuesta humoral frente al antígeno soluble CGG con un incremento en la producción de diferentes isotipos de IgG y generación de memoria humoral (195, 196). Más recientemente ha sido mostrado que adyuvantes que no contienen PAMPs, (IFA y Montanide), pero producen DAMPs, inducen células Tfh de manera dependiente de MyD88 e IFN-I estando también la IL-6 involucrada en este accionar ((197). Si bien, no hemos estudiado la respuesta humoral en animales *Ifna1*^{-/-}, los IFN-I podrían ser los responsables del marcado incremento en la magnitud de anticuerpos generado por nuestra estrategia de formulación.

Como mencionamos en la introducción, una de las cualidades importantes a las que aspira un adyuvante ideal es su capacidad de permitir la reducción de la dosis de antígeno sin afectar la eficiencia de la respuesta inmune generada. En este estudio, hemos demostrado que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 permite la reducción del antígeno OVA a un nivel tres veces inferior sin cambios significativos ni en los títulos de anticuerpos generados ni en el nivel de la citoquina característica del perfil celular Th1, IFN- γ (**Fig. 1.4**). Previamente, nuestro grupo demostró que el coagel permite la reducción de la dosis de CpG-ODN a más de la mitad sin afectar la respuesta adaptativa (108). Hipotetizamos que esto se debe a la capacidad del coagel de retener OVA y tal vez CpG-ODN en el sitio de inyección, reduciendo su distribución sistémica y optimizando así la interacción de los componentes de la vacuna con células de la

respuesta inmune. En conjunción, estos datos sugieren que el coagel tendría la capacidad de generar una respuesta inmune eficiente con mínimas dosis de antígeno o adyuvante, una cualidad muy buscada en el caso de pandemias en donde se requiere una rápida manufacturación a gran escala.

En relación a este último resultado, también observamos que la formulación del CpG-ODN con el Coa-ASC16 permite la reducción del número de inmunizaciones de tres a una única inyección sin tener mayores impactos sobre su efectividad en la estimulación de la respuesta tanto humoral como celular T CD8+ (**Fig. 1.5 y Fig. 2.5**). En cambio, la respuesta humoral inducida por la solución OVA/CpG-ODN, que genera títulos significativos de IgG con tres inmunizaciones, se ve drásticamente perjudicada en ausencia de dosis de refuerzo llegando al punto de no lograr la seroconversión ni, consecuentemente, generar memoria humoral. En el esquema de vacunación con una sola dosis, adicionalmente, la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mantiene su capacidad de inducir anticuerpos de isotipo IgG2c, demostrando una polarización asociada a un perfil de respuesta Th1 capaz de mantenerse a lo largo del tiempo (memoria humoral) (**Fig. 1.5 B**). Un dato curioso es que los niveles de anticuerpos tanto IgG como IgG2c generados en animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 no se vieron significativamente afectados tras el desafío con el antígeno 147 días post inmunización y fueron comparables con los títulos generados tras un esquema de 3 inmunizaciones. Estos resultados sugieren que la inmunización con esta estrategia parece generar una producción de anticuerpos que llega a un cierto nivel de saturación a partir de la cual un segundo contacto con el antígeno no genera cambios sustanciales. Por otra parte, si bien la reducción del número de inmunizaciones con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 no parece afectar significativamente la respuesta humoral, aún no se ha estudiado la calidad de los anticuerpos generados utilizando una única dosis de inmunización. Teniendo en cuenta los resultados reportados previamente por este grupo, en donde se ha descrito que el coagel actúa como sistema “depot” para la OVA y quizás para el CpG-ODN (resultado aún no comprobado) sumado a su capacidad de promover un microambiente proinflamatorio local con liberación de DAMPs y reclutamiento de células de la respuesta innata (109) podríamos especular que esta nanoestructura estaría creando un microambiente inmunoquímico particular en el sitio

de inyección y/o en los LNs drenantes. De esta forma, esta formulación estaría facilitando el encuentro del antígeno con las APCs y simultáneamente activando al sistema inmune innato (mediante DAMPs liberados por acción del mismo Coa-ASC16 sumados al efecto inmunoestimulante del CpG-ODN) (109). Esta cualidad dual que provee el coagel de actuar tanto como sistema “depot” así como inmunoestimulante probablemente sea la razón por la cual las diferencias en el efecto sobre el sistema inmune tanto humoral como celular entre la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 y OVA/CpG-ODN sean aún más pronunciadas al reducir el número de inmunizaciones. Estos resultados son prometedores para el desarrollo de nuevas vacunas, ya que la reducción en el número de inmunizaciones es crucial no sólo por sus implicancias en términos de costos y practicidad sino también por el simple hecho de que frecuentemente, los individuos no cumplen con los esquemas de inmunización que requieren más de una dosis derivando finalmente en el desarrollo de una protección deficiente. Las inmunización con antígenos proteicos altamente purificados en general resulta en la inducción de una respuesta inmune humoral y celular modesta y requiere por lo tanto de múltiples inmunizaciones para lograr una protección óptima (10).

El gran desafío para las vacunas aún en desarrollo es lograr superar la difícil tarea de generar una respuesta protectora del tipo celular adecuada complementaria a la protección mediada por anticuerpos. Es por ello que, diversos grupos de investigación continúan trabajando en el diseño de nuevas estrategias adyuvantes que permitan vencer este obstáculo. Gran parte de la dificultad de esta tarea recae sobre el pobre conocimiento que se posee sobre los mecanismos por los cuales actúan los adyuvantes o las vacunas en sí. El avance sobre el entendimiento de estos procesos es de vital importancia para el diseño racional de vacunas futuras.

Dado nuestros conocimientos previos sobre la capacidad de esta estrategia adyuvante para potenciar la respuesta humoral y celular Th1 (108), nos propusimos como objetivo principal estudiar su capacidad para generar una respuesta celular T CD8+. Lograr inducir esta respuesta en vacunas es crucial para el combatir patógenos intracelulares como HIV, hepatitis C, malaria o para el desarrollo de terapias antitumorales (198, 199).

Dado que la mayoría de los estudios previos del grupo se habían realizado con un esquema de tres inmunizaciones comenzamos analizando la existencia de este tipo de respuesta utilizando el mismo esquema. Notablemente, hemos demostrado que esta estrategia de formulación logra la generación de una respuesta celular efectora T CD8+ muy fuerte, alrededor de cuatro veces superior a la generada por OVA/CpG-ODN u OVA/Coa-ASC16 (**Fig. 2.1 A**). Estos resultados no sólo demuestran la importancia de la nanoestructura en la formulación para inducir una respuesta celular T CD8+ sino que nuevamente, si bien el coagel potencia la respuesta, el aporte de la actividad impartida por el CpG-ODN es indispensable y se requiere de ambos componentes para lograr un efecto óptimo. En concordancia con este resultado, la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 también generó la producción de cantidades tres veces mayores de IFN- γ (**Fig. 2.1 B**), citoquina efectora primordial en la respuesta de mediada por células T CD8+ y muy importante en la activación de la respuesta innata para el control de una infección. Sorprendentemente, cuando redujimos el número de dosis de tres a una, en forma similar a lo que observamos sobre la respuesta humoral, la magnitud de la respuesta celular T CD8+ no se vio prácticamente afectada demostrando que una única inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es suficiente para lograr una respuesta significativa de células T CD8+. Estos resultados muestran la capacidad de la nanoestructura de potenciar la actividad adyuvante del CpG-ODN a un nivel comparable con otras estrategias de formulación mucho más complejas y costosas. Por ejemplo, la respuesta de células T CD8+ citolítica inducida por CpG-ODN/Coa-ASC16 es similar a la inducida tras una inmunización por una nanoemulsión (aceite-agua-aceite) combinada con CpG-ODN (200), por CpG-ODN nanoparticulado con un β -glucano (201) o por el CpG-ODN conjugado con un lípido de unión a albúmina tras dos inmunizaciones (202). En relación a otros agonistas de TLRs utilizados como sistemas adyuvantes, la respuesta celular T CD8+ inducida en nuestra estrategia es similar a la generada por liposomas catiónicos (CAF09) combinados con Poly(I:C) (agonista de TLR3) tras tres inmunizaciones (203).

Con estos resultados obtenidos en relación a los linfocitos T CD8+ inducidos durante la fase efectora surgen múltiples interrogantes sobre cuáles son los posibles

mecanismos desencadenados por la formulación propuesta para generar dicha respuesta.

Aunque en general, la generación de una respuesta celular T CD8+ requiere de la asistencia mediada por células Th, ha sido descrito que en ciertas infecciones mediadas por patógenos intracelulares como *Vaccinia virus* o LCMV pueden saltarse este paso sin afectar la respuesta efectora celular T CD8+ generada (167, 204, 205). Consistentemente con estos resultados, también ha sido reportado que el CpG-ODN puede desencadenar una respuesta primaria de células T CD8+ en forma independiente de Th (139, 140). Este fenómeno está asociado a la capacidad de estos patógenos o del CpG-ODN de activar fuertemente a las DCs sin la necesidad de señales adicionales aportadas por otras células. Un elegante trabajo de Johnson y colab. ha postulado que el mecanismo por el cual algunos agonistas de los TLRs (específicamente de TLR9 y TLR3) y el virus de influenza promueven este tipo de activación a través de la promoción del incremento de expresión de CD40L en las DCs y su consecuente interacción con CD40 de las células T CD8+, un hecho crucial para la inducción de respuesta celular T CD8+ (140). Además, se ha reportado que la combinación de una estrategia de formulación que actúe como sistema de direccionamiento y entrega modulada del antígeno hacia órganos linfáticos (micropartículas, nanopartículas, entre otros) sumada a la presencia de inmunoestimulantes, puede lograr la activación de células T CD8+ en forma independiente de Th. Consistentemente con esto, un trabajo de Zaks y colab. muestra como el adyuvante CpG-ODN formulado en liposomas catiónicos, que migran hacia los LNs drenantes y son internalizados por APCs, es capaz de generar este tipo de respuesta de células T CD8+ de manera independiente de células Th (206). En este trabajo, demostramos que nuestra estrategia adyuvante, a pesar de no tratarse de un sistema particulado cerrado con capacidad de actuar como vehículo para dirigir y entregar su cargo (antígeno y CpG-ODN) en los LNs drenantes, también es capaz de saltar la necesidad de asistencia mediada por células Th para generar una buena respuesta de células T CD8+ primaria (**Fig. 2.7**). La capacidad de generar una respuesta de células T CD8+ independiente de Th como estrategia adyuvante podría ser beneficiosa en casos donde se precise inducir una inmunidad mediada por células efectiva en individuos con inmunosupresión crónica o inmunodeficiencias que

presentan células Th con función reducida o ausente. Sin embargo, esto no quiere decir que las células Th no sean necesarias para generar una buena respuesta de memoria.

Para que una vacuna pueda inducir repuesta de células T CD8+ utilizando un antígeno exógeno soluble, las DCs deben internalizar altas cantidades del antígeno exógeno para dirigirlo hacia la vía de presentación MHC-I en un fenómeno denominado “presentación cruzada” (130). Además, para que dichas DCs puedan activar células T CD8+ deben expresar un nivel de moléculas coestimuladoras adecuado. El grado de coestimulación o activación de las DCs necesario para activar los linfocitos T se logra por medio de su interacción con PAMPs. Es por ello que, un punto clave para desarrollar vacunas a subunidad eficaces es ser capaz de codirigir antígeno y adyuvante (PAMPs) hacia la misma APC y hacia los órganos linfáticos donde se desencadena la respuesta inmune adaptativa (151, 207, 208). Adicionalmente, ha sido reportado que el CpG-ODN 1826 (utilizado en este trabajo) promueve la presentación cruzada de un antígeno particulado (OVA absorbida en perlas de poliestireno) en DCs a través de un mecanismo dependiente de IFN-I al incrementar la expresión de moléculas MHC-I (209). Asimismo, el CpG-ODN incrementa la presentación cruzada de antígenos asociados a células muertas por medio de la subpoblación de DCs CD8 α + a través de la inducción de moléculas coestimuladoras y modificación de la velocidad de degradación del antígeno (210). Por lo tanto, en una forma simplista, podemos decir que el CpG-ODN actúa sobre las DCs de dos formas, induciendo la expresión de moléculas coestimuladoras y promoviendo la presentación cruzada de antígeno. Está ampliamente reportado que la unión covalente entre OVA y CpG-ODN aumenta significativamente la eficacia de la presentación y activación cruzada ya que asegura la internalización del antígeno y el adyuvante por la misma APC (154). Como se describió previamente, este proceso permite que, tanto el antígeno como las señales PAMPs necesarias para activar la APC sean proporcionadas a la misma célula para finalmente generar una respuesta de células T CD8+ más eficiente (142-144). Sin embargo, el proceso de conjugación química del CpG-ODN con antígenos o alérgenos, además de ser sumamente costoso, puede perturbar la estructura del antígeno afectando sus propiedades inmunoestimulantes (211). Sorprendentemente, en nuestro modelo experimental, las DCs provenientes de los LNs drenantes tras inmunización s.c. con OVA/CpG-ODN/Coa-

ASC16 fueron capaces de internalizar tanto antígeno como adyuvante a pesar de no estar ligados covalentemente (**Fig. 2.4**). El “uptake” simultáneo de ambos componentes sólo fue observado en presencia del coagel. Siguiendo con la idea de que la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 no estaría ingresando a las células, especulamos que este efecto está relacionado con el microambiente inflamatorio inducido por la misma y el efecto “depot” para el antígeno promovido por el Coa-ASC16 en el sitio de inyección (108, 109). La respuesta inflamatoria inducida por CpG-ODN en el sitio de inyección fue previamente estudiada (212). En relación al coagel, nuestro grupo ha demostrado que el Coa-ASC16 tiene propiedades inflamatorias que involucran la señalización a través de DAMPs como DNA de doble cadena liberado tras necrosis local (en el sitio de inyección) de células residentes (108, 109). Así, las células necróticas que previamente internalizaron al antígeno dentro de un entorno inflamatorio podrían estar ofreciéndolo de manera particulada a las APCs para su fagocitosis y captación celular. Esto estaría en línea con el trabajo de Gamrekelashvili y colab. que mostraron que células tumorales necróticas sólo pueden inducir una respuesta de células T CD8+ si se adiciona CpG-ODN como PAMP a los DAMPs liberados en el sitio (213). Por otra parte, si bien aún no hemos comprobado que el sistema “depot” para la OVA generado por el coagel sea realmente necesario para inducir una buena respuesta inmune adaptativa podemos especular que aumenta las probabilidades de interacción entre las células de la respuesta innata y el antígeno.

Adicionalmente, especulamos que puede existir otro mecanismo mediante el cual la presencia del coagel puede estar favoreciendo la presentación cruzada de la OVA para la inducción de la respuesta de células T CD8+ observada. Durante las últimas décadas, varios biomateriales han sido diseñados para alterar activamente la membrana endosomal y entregar la carga antigénica en el citoplasma (214, 215) facilitando la presentación antigénica de antígenos solubles exógenos en un contexto MHC-I a células T CD8+. El coagel no es una nanopartícula sino que consiste en una nanoestructura abierta bilamelar anfifílica altamente ordenada y es muy probable que tanto la OVA como el CpG-ODN se encuentren dentro de la estructura en el entorno acuoso (102). Teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas del coagel creemos que es poco posible que el mismo sea internalizado por células fagocíticas de la

inmunidad innata del sitio de inyección o de los LNs drenantes; también creemos que el coagel no se distribuye de manera sistémica, sino que permanece como tal en el sitio de inyección hasta ser degradado por esterasas. Previamente, ha sido probado a través de modelos in vitro, que el monómero ASC16 tiene la propiedad de disrumpir membranas (150). Además, hemos mostrado que la inyección in vivo de Coa-ASC16, probablemente debido a sus propiedades surfactantes, produce lisis celular transitoria local en el sitio de inyección (109). La capacidad de disrupción de membranas pertenecientes a distintos compartimentos celulares puede promover la distribución del antígeno y del CpG-ODN dentro de las APCs facilitando la inducción de ciertos procesos de presentación antigénica. Si especulamos que cabe alguna posibilidad de que el coagel sea internalizado por las APCs, es interesante averiguar si es capaz de desestabilizar membranas de bicapas lipídicas dentro de un rango de valores de pH que simulan diferentes condiciones de organelas endocíticas. Los resultados arrojados por el ensayo de hemólisis muestran que la capacidad lítica del Coa-ASC16 es pH-independiente dentro de un rango superior a 6,8 correspondiente a un pH cercano al neutro (pH del medio extracelular) (**Fig. 2.3 B**). Al contrario de los biomateriales de “delivery” diseñados para adquirir una actividad desestabilizante de membranas a pH ácidos, correspondientes a compartimentos endosomales, el coagel parece disminuir su capacidad lítica al acercarse a un pH asociado a endosomas tardíos (pH<6,8). Sin embargo, al pH de 6,8 (correspondiente a endosomas tempranos) mantiene su capacidad de lisis. En conclusión, si bien es poco probable que el coagel sea endocitado por APCs, no se descarta la posibilidad de que esté facilitando la disrupción de endosomas incrementando el escape del antígeno proteico hacia el citosol. Sin embargo, es necesario realizar más estudios para lograr una conclusión sólida.

Enfocándonos en posibles citoquinas inducidas por el coagel que puedan estar promoviendo la respuesta de células T CD8+, nos enfocamos en la IL-6 y los IFN-I. Algunos estudios proponen a la IL-6 como esencial para la promoción directa o indirecta de la respuesta de células T CD8+ durante el control de diversas infecciones virales, por ejemplo las producidas por el virus del herpes simple y el virus de ectromelia (148) o en respuesta a la formulación adyuvante MPL, un agonista de TLR4 formulado en sales de aluminio (147). Siguiendo un razonamiento similar al descripto

para la respuesta humoral nos preguntamos si la IL-6 tenía un rol en la inducción de la respuesta de células T CD8+ efectora inducida por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16. Sin embargo, en nuestro sistema, esta citoquina tampoco parece participar en la generación de este tipo de respuesta celular (**Fig. 2.2**). Las otras citoquinas estudiadas como candidatas en la promoción de una respuesta de células T CD8+ son los IFN-I que operan por múltiples mecanismos. Los IFN-I promueven esta respuesta actuando directamente sobre las células T CD8+ o de manera indirecta a través de las APCs (156, 157, 216). Brevemente, en forma directa, se ha descrito que los IFN-I pueden actuar como tercera señal durante la activación de células T CD8+ promoviendo su proliferación, supervivencia y diferenciación hacia células efectoras. En forma indirecta, los IFN-I pueden actuar induciendo citoquinas involucradas en la diferenciación de monocitos a DCs. Asimismo, pueden actuar sobre las mismas APCs induciendo producción de quimioattractantes de linfocitos T CD8+ o aumentando su actividad presentadora mediante el sustento de MHC-II y el incremento de su capacidad de procesamiento antigénico. Incluso, se ha visto que la co-inyección de OVA con IFN- α incrementa el proceso de activación cruzada (activación de células T CD8+ por medio de DCs frente a antígenos exógenos) de linfocitos T CD8+ específicos de antígeno al retrasar la acidificación de los endosomas (217) e induce el redireccionamiento de antígenos hacia vías de presentación en contexto MHC-I (218, 219). Teniendo en cuenta el incremento en el “uptake” de OVA y CpG-ODN inducido en los LNs drenantes tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (**Fig.2.4**) sumado a que, inevitablemente, debe haber presentación cruzada para que la OVA exógena sea presentada en un contexto MHC-I a células T CD8+, nos preguntamos si la producción de IFN-I participa en la inducción de esta fuerte respuesta celular T CD8+. Si bien los CpG-B, como el que utilizamos en este trabajo, no están caracterizados por inducir la producción de IFN-I, notablemente, observamos que esta señalización era indispensable para la inducción de la respuesta celular T CD8+ generada por la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (**Fig. 2.8**). Resultados similares fueron descritos en el uso de vacunas en base a DNA con motivos CpG no metilados en donde dichas vacunas precisan de la vía de señalización mediada por IFN-I para regular la expresión de moléculas coestimuladoras y proteínas involucradas en la carga del antígeno por MHC-I en APCs y finalmente

activar células T CD8⁺ (220). El CpG-A, por otro lado, como ya mencionamos, es capaz de activar macrófagos y pDCs y DCs mieloides para la producción de IFN-I (56). Dadas las dificultades previamente descritas respecto a los CpG-A, muchos grupos de investigación están enfocados en diseñar estrategias para convertir CpG-B en un tipo de CpG-ODN inductor de IFN-I (221, 222). De todas formas, aún no están claros los mecanismos por los cuáles el CpG-B formulado en el coagel actúa sobre la respuesta inmune innata induciendo la secreción de IFN-I. Además, desconocemos si esta cualidad está dada por la formulación CpG-ODN/Coa-ASC16 o si el Coa-ASC16 puede desencadenar esta respuesta “per se”, sin la necesidad de la presencia del CpG-ODN. Sin embargo, especulamos que la capacidad de producción de IFN-I es la principal razón por la cual observamos una respuesta T CD8⁺ similar a la que inducen los CpG-A. Dado que las diferencias inmunoestimulantes entre estas dos familias de CpG-ODN están ampliamente ligadas a su estructura (56), hipotetizamos que quizás el coagel o el proceso de formulación afecta de algún modo la estructura del CpG-ODN clase B y/o al antígeno OVA. Por las propiedades fisicoquímicas del coagel, resulta muy difícil estudiar las interacciones presentes entre los dos componentes hidrofílicos (OVA y CpG-ODN) y el coagel, una vez formada la estructura bilamelar. No obstante, decidimos estudiar si el proceso de calentamiento que conlleva preparar la formulación perturba de algún modo la estructura nativa de la OVA y/o del CpG-ODN o si genera nuevas interacciones o agregados. Ambos componentes, tratados o sin tratar con calor, presentaron la misma movilidad tras su corrida en un gel de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes, sugiriendo que no se ven afectados por el proceso de calentamiento. No obstante, se puede observar la aparición de algunos agregados de mayor peso molecular cuando la OVA es calentada en presencia del CpG-ODN (**Fig. 2.3 A**). Una posible explicación es que la OVA al calentarse sufre cierto grado de desnaturización, pero es capaz de volverse a plegar en su forma original durante el periodo de enfriamiento a temperatura ambiente. En cambio, cuando el CpG-ODN está presente en la solución, probablemente interfiere de alguna forma en este plegamiento resultando en la aparición de agregados proteicos que difieren de la estructura nativa. De todas formas, no observamos un cambio radical en la estructura del antígeno como para justificar el efecto en la respuesta inmune observado con la formulación. Las

posibles interacciones o agregados que podrían infringirse en presencia del coagel aún no han sido determinados.

Un concepto interesante que ha ido creciendo durante los últimos años es que es para estudiar realmente la eficiencia de una respuesta inmune celular, es importante evaluar tanto magnitud como calidad de la misma (223). Sin embargo, debido principalmente a dificultades técnicas, por muchos años se caracterizó la respuesta de células T en base a la frecuencia de células T capaces de ejercer una única función como la producción de IFN- γ (cuando nos referimos a frecuencia abarcamos tanto porcentaje como número total de células). En los últimos años ha surgido el concepto de “células T multifuncionales” (o polifuncionales) como modo de caracterización de la calidad de la respuesta celular T. Dichas células, contienen la habilidad de producir y secretar simultáneamente una variedad de moléculas (citoquinas y quimoquinas) efectoras y, por lo tanto, de cubrir multitud de funciones. Una mayor frecuencia de células polifuncionales T correlaciona, en general, con una mayor eficacia en su capacidad funcional. De hecho, estudios recientes han demostrado que existe una correlación entre frecuencias altas de células T polifuncionales con la capacidad de control el HIV en individuos infectados (224) o con la protección mediada por vacunas contra *Leishmania major* en un modelo murino (225). En este trabajo, hemos demostrado que el uso de OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 incrementa significativamente tanto la expansión de células T CD8+ tetrámero positivas (magnitud) (**Fig. 2.9**) como la cantidad de células T CD8+ multifuncionales (calidad) (**Fig. 2.10**) en comparación con las demás estrategias de inmunización. En un primer lugar, podemos observar la diferencia entre la respuesta generada por el tratamiento con las distintas vacunas y aquella inducida tras una infección con $\Delta ActA$ LM-OVA. Los animales infectados muestran una mayor frecuencia de células T CD8+ secretoras de citoquinas dobles (TNF- α +IFN- γ +) o simples (IFN- γ + e IL-2+) positivas lo que coincide con un patrón de respuesta efectora primaria. Si comparamos las dos formulaciones vacunales entre sí, (OVA/CpG-ODN) y (OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16), podemos observar que el patrón de expresión de las citoquinas estudiadas difiere principalmente en la expresión de IFN- γ y TNF- α . Los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 tienden a producir principalmente IFN- γ sólo o en combinación con TNF- α y/o IL-2 mientras que la

inmunización con OVA/CpG-ODN promueve la expresión mayormente de TNF- α aislado o en combinación con IL-2 marcando una ligera diferencia en el patrón de expresión inducido por las diferentes formulaciones vacunales. Además, la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce un marcado aumento de células polifuncionales triples (IFN- γ +TNF- α +IL-2+) o doble (IFN- γ +TNF- α + y TNF- α +IL-2+) positivas (**Fig. 2.10**) con respecto a su contraparte soluble OVA/CpG-ODN. Particularmente, la producción de IL-2 puede no ser absolutamente esencial para una respuesta efectora primaria eficiente, pero ha sido descrita como requisito para la inducción y estabilidad de células T CD8+ de memoria (226) y es por ello que es de especial interés en el marco del desarrollo de vacunas. Adicionalmente, muchos estudios en modelos murinos y primates han reportado que células T CD4+ y T CD8+ capaces de producir IL-2 o simultáneamente IFN- γ , TNF- α e IL-2 (pluripotenciales), preferentemente sobreviven a la contracción y proveen de una mejor respuesta protectora tras un nuevo desafío que células productoras de una sola citoquina (monofuncionales) (183, 223, 227-229). Es por eso que creemos que estos resultados obtenidos durante la fase de expansión primaria sugieren la futura generación de células de memoria de buena calidad.

Para finalizar la caracterización de la respuesta de células T CD8+ efectora, evaluamos su eficacia frente a un modelo de infección con *LM-OVA*. El mecanismo por el cual esta bacteria infecta es bien conocido. Brevemente, la bacteria invade las células del hospedador y se replica en el citosol permitiendo la presentación de antígenos en un contexto MHC-I y promoviendo la respuesta de células T CD8+ necesaria para su eliminación (158, 230). Dado que esta bacteria se expande infectando células contiguas sin tomar contacto con el medio extracelular, evade la respuesta humoral y de complemento por lo que se convierte en un modelo ideal para el estudio de la respuesta mediada por células T CD8+. Aquí, mostramos como la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 es capaz de inducir una protección mediada por células T CD8+ contra *LM-OVA* superior en magnitud (**Fig. 2.12**) y calidad (**Fig. 2.13**) a las demás estrategias adyuvantes estudiadas. Dicha respuesta fue comparable con otros reportes, por ejemplo donde utilizan vectores virales como medio de inmunización (231). En concordancia con estos resultados, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 generaron una protección más eficiente resultando en una reducción de UFC en

hígado sustancialmente mayor que la obtenida en animales inmunizados con su contraparte soluble OVA/CpG-ODN (**Fig. 2.15**). Dado que los ratones son evaluados en un periodo relativamente corto tras la inmunización (día 7 post vacunación), es importante considerar que es posible que la respuesta inmune innata también posea un rol importante en el control de la infección. Sin embargo, el número de UFC obtenido tras la inmunización con el adyuvante sin el antígeno (CpG-ODN/Coa-ASC16) no mostró diferencia alguna con el presente en animales control infectados sin previa inmunización demostrando que, en el periodo estudiado, la respuesta inmune innata inducida por la vacunación no tiene una participación significativa en el control de la infección (**Fig. 2.15**). También podemos observar que los patrones de expresión de citoquinas producidos en animales inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 (respuesta específica de antígeno) son similares y se ven predominantemente representados por células polifuncionales. En cambio, la respuesta inmune generada en animales inmunizados con CpG-ODN/Coa-ASC16 (en ausencia del antígeno) o no inmunizados infectados con *LM*-OVA presentan una respuesta predominantemente dirigida por células monofuncionales (**Fig. 2.13 B**) con alto grado de desgranulación (representado por el marcador CD107a) que se corresponde con una necesidad de función citolítica más inmediata.

Todos estos resultados resaltan el potencial que posee esta innovadora estrategia de formulación del CpG-ODN para fomentar una respuesta de células T CD8+ efectora eficaz, utilizando un antígeno exógeno soluble. Este efecto es sumamente importante tanto por su potencial en vacunas terapéuticas para alergias, enfermedades infecciosas crónicas o tratamientos antitumorales. Sin embargo, el objetivo primordial tradicional de una vacuna es su uso como agente profiláctico, y para ello, es esencial generar una respuesta protectora efectiva, que perdure en el tiempo y proteja al individuo contra eventuales encuentros con el patógeno a lo largo de su vida. Para ello, la vacuna ideal debe generar memoria tanto humoral como celular. La capacidad de esta formulación de generar una memoria humoral fue previamente demostrada por este grupo en ratones BALB/c (108) y corroborada en este trabajo en ratones C57BL/6 (**Fig. 1.5**).

En la tercera y última parte de este trabajo, demostramos la capacidad de esta innovadora estrategia de formulación del CpG-ODN para generar células T CD8+ de memoria con tan sólo una inmunización.

Iniciamos analizando los precursores de células T CD8+ tetrámero positivas efectoras y de memoria inducidas al día 7 tras inmunización o infección con $\Delta ActA$ LM-OVA. Podemos observar que existe una tendencia en la cual, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 presentan una proporción de células MPECs muy similar mientras que los animales infectados tienen, en comparación, una mayor producción de SLECs. Estos resultados son coherentes con el hecho de que una infección (microorganismo replicativo) precisa la generación de una mayor cantidad de células efectoras de corta vida para controlar la infección inminente. En cambio, la inmunización con un antígeno proteico (no replicativo) combinado con un adyuvante tiene un efecto más sutil sobre la respuesta inmune induciendo una proporción ligeramente mayor de células precursoras de memoria (**Fig. 3.2 C-E**). Esta describe que el microambiente inflamatorio generado en el momento de inducción de la respuesta inmune, puede modular directamente el número, migración y función de las células T CD8+ de memoria (232). Cui y colab. mostraron que los distintos microambientes inflamatorios inducidos bajo dos estrategias adyuvantes diferentes (LPS vs MPL, ambos agonistas de TLR4) repercuten de manera diferencial en la generación de células T CD8+ de memoria (233). Por otro lado, a pesar de diversas controversias, aún muchos investigadores defienden el concepto de que existe una relación lineal entre la magnitud de las poblaciones de memoria y la magnitud de las poblaciones inducidas en la fase efectora (234-236). Sin embargo, este concepto surge de modelos de infección y debe tenerse cuidado al ser trasladado a modelos de vacunación. En nuestro sistema, podemos observar que la diferencia más significativa en las poblaciones de precursores observadas entre las dos estrategias de inmunización, OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16, está en la magnitud (número total) de células MPECs (**Fig. 3.2 F**). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la formulación del CpG-ODN con el Coa-ASC16 no está afectando la proporción de células T CD8+ en expansión que se diferenciarán a células de memoria, sino que más

bien la diferencia parte del número de clones en la fase expansión que ya demostramos es mayor al utilizar la plataforma nanoestructurada.

Con el objetivo de caracterizar la cinética de la respuesta primaria y secundaria de células T CD8+ tras diferentes estrategias de inmunización, realizamos una cinética en sangre de células T CD8+ tetrámero K^b-SIINFEKL positivas utilizando la infección con *ΔActA LM-OVA* como desafío para iniciar una segunda expansión de clones T CD8+ (memoria). Sorprendentemente, a pesar de la baja expansión clonal primaria (día 7 de la cinética) observada en los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN en comparación con aquellos inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16, ambos grupos desarrollaron una expansión clonal secundaria considerable entre los días 3 y 5 post desafío (**Fig. 3.3**). Sin embargo, el número relativo de células T CD8+ tetrámero positivas en los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 siempre fue superior en comparación a los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN. Lamentablemente, no tenemos los datos del número absoluto de células T CD8+ tetrámero positivas en sangre donde quizás encontraríamos mayor diferencia entre ambas estrategias adyuvantes. Como era de esperar, la respuesta de células T CD8+ tetrámero positivas en animales inmunizados con el adyuvante en ausencia del antígeno (CpG-ODN/Coa-ASC16) tras la infección, se comporta de forma muy similar a una respuesta primaria, dado que es el primer contacto que recibe el animal con el antígeno. Estos datos los podemos notar al comparar las curvas de células tetrámero positivas de los animales no inmunizados control que fueron infectados el mismo día que los animales previamente inmunizados con CpG-ODN/Coa-ASC16. Otro dato que nos brinda esta cinética es el llamativo comportamiento de las células de memoria secundaria inducidas por ambos grupos de inmunización OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 que se mantienen en porcentajes muy altos y estables durante al menos un mes post desafío con *ΔActA LM-OVA*. Algunos trabajos, en situaciones similares donde se infecta tras una inmunización se corresponden con nuestros resultados mostrando el mantenimiento sostenido en el tiempo de los clones de memoria por periodos de hasta al menos 40 días post desafío (237, 238), aunque los niveles de células T CD8+ específicas nunca llegan a los porcentajes que manejamos aquí. Estos datos nos llevaron a interrogarnos qué está pasando con esos clones respecto a su capacidad de auto-renovación tras haber

eliminado el patógeno y a su capacidad funcional. Dichos interrogantes deberán ser considerados en posteriores estudios ajenos a este trabajo.

En vacunas, la gran dificultad recae en la generación de una respuesta de memoria de células T CD8+ eficiente. Recientemente, se está expandiendo la idea del desarrollo de las llamadas “vacunas inductoras T”. Dichas vacunas, están diseñadas para inducir respuestas de células T CD4+ y/o T CD8+ de una magnitud y fenotipo determinado para combatir microorganismos que precisan de esta respuesta adicional a la protección por anticuerpos (239). Dentro de las vacunas T inductoras más populares podemos mencionar las vacunas a DNA que son simples de producir y con buenos resultados en la producción de respuesta humoral y celular (240). Sin embargo, a pesar de su éxito en estudios preclínicos, los ensayos clínicos no han sido tan favorables. En humanos, a pesar de que las vacunas a DNA son seguras y logran inducir respuesta T, la magnitud de dicha respuesta es muy débil y muchas veces insuficiente para lograr una protección adecuada (241). Se han realizado diferentes esfuerzos para mejorar la inmunogenicidad de estas vacunas, pero los resultados no han sido alentadores. Algo similar ocurrió con vacunas que utilizan péptidos sintéticos como antígenos (242, 243). Otros estudios se han concentrado en el estudio de adyuvantes para aumentar la inmunogenicidad de vacunas en base a proteínas, pero nuevamente, los resultados preclínicos no logran generar una magnitud adecuada de respuesta de células T CD8+ y muchos de ellos ni siquiera han sido testeados en ensayos clínicos (198).

En este trabajo, evaluamos la capacidad de la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 de generar una respuesta de células T CD8+ de memoria en comparación a su contraparte soluble OVA/CpG-ODN, desafiando ambos grupos en el día 34 post inmunización con $\Delta ActA$ LM-OVA (**Fig. 3.4 A**). El objetivo de sacrificar a los animales para su estudio a tan sólo tres días post infección fue justamente asegurarse de que las células T CD8+ estudiadas pertenecían a los clones de memoria generados por la inmunización que estaban expandiéndose en reacción a la infección y no a una expansión primaria que ya demostramos, demora entre 5 y 7 días para llegar a ser detectable por medio de tetrámeros. En este diseño experimental pudimos apreciar diferencias entre los ratones inmunizados con OVA/CpG-ODN y OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 que en la cinética en sangre no eran tan fáciles de distinguir. En primer lugar, la

formulación del CpG-ODN en la nanoestructura genera clones de memoria que, al detectar al antígeno nuevamente, sufren una segunda expansión mayor que aquellos clones generados tras la inmunización sin la nanoestructura con un porcentaje y número total de clones muy superior (**Fig. 3.4 B-C**). Este resultado es valioso, ya que a pesar de que posteriormente es probable que las magnitudes de memoria generadas por ambas estrategias adyuvantes lleguen a un nivel similar de expansión, la velocidad y capacidad de respuesta es mayor al usar el CpG-ODN formulado en Coa-ASC16. En infecciones agudas severas, esta cualidad puede hacer la diferencia en el control de la infección. Cuando analizamos la funcionalidad de esos clones de memoria mediante el estudio de secreción de citoquinas efectoras podemos ver que nuevamente, los clones de memoria generados tras la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 superan en cantidad a aquellos generados por la inmunización con OVA/CpG-ODN resultando una mayor frecuencia de células polifuncionales (IFN- γ + TNF- α +) y monofuncionales productoras de IFN- γ (**Fig. 3.6**).

Hasta aquí, demostramos que la nueva estrategia de formulación del CpG-ODN induce células T CD8+ de memoria superiores en magnitud, calidad y velocidad de respuesta tras el reestímulo con el antígeno en comparación con su contraparte soluble. No obstante, lo más importante es probar si esta supuesta “mejora” adquirida en la respuesta de memoria celular T CD8+ realmente hace a la diferencia a la hora de enfrentar una infección. Con este objetivo, finalizamos este trabajo comparando la eficacia de la protección mediada por las células T CD8+ de memoria generadas por inmunización con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 frente a una infección con *LM-OVA*. Paralelamente se inmunizó un grupo con CpG-ODN/Coa-ASC16 como control de la respuesta inmune específica de antígeno. En un primer ensayo, los animales inmunizados fueron infectados durante la fase de memoria (día 30 post inmunización) junto a un grupo control no inmunizado y sacrificados 5 días post infección. Como sucede ante cualquier infección con un patógeno intracelular, lógicamente los animales responden al microorganismo generando una respuesta de células T CD8+ primaria efectora que normalmente llega a un pico alrededor del día 7 post infección. En el periodo de tiempo estudiado, la respuesta primaria de células T CD8+ se encuentra en plena expansión y debe tenerse en cuenta. Cuando observamos

el porcentaje y el número total de células T CD8+ tetrámero positivas en bazo, nuevamente, los resultados demuestran que la respuesta es superior en animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 en comparación con aquellos inmunizados con OVA/CpG-ODN (**Fig. 3.8 A-B**). La comparación con los grupos controles que no tuvieron contacto previo con el antígeno y por lo tanto desarrollaron sólo una respuesta primaria (animales inmunizados con CpG-ODN/Coa-ASC16 o no inmunizados), nos permite confirmar la existencia de células T CD8+ de memoria en los grupos que fueron inmunizados con las dos formulaciones que contenían al antígeno. Asimismo, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 lograron disminuir la carga bacteriana en hígado en alrededor de dos unidades logarítmicas en comparación con los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN (**Fig. 3.8 C**). Los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN, a pesar de lograr reducir la cantidad de UFC, no aportan una respuesta estadísticamente significativa en comparación con el grupo inmunizado con CpG-ODN/Coa-ASC16 o con el grupo infectado sin previa inmunización. En conjunción, la reducción de la carga bacteriana en hígado sumado al aumento significativo de células T CD8+ tetrámero positivas en bazo en animales inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 nos confirma que la protección observada en la fase memoria es conferida, al menos en parte, por células T CD8+ de memoria. Estos resultados apoyan fuertemente la idea de que la formulación realmente logra generar una respuesta celular T CD8+ de memoria protectora superior a aquella generada por el CpG-ODN sin formular. El interrogante que surge a continuación es si, a pesar de que la inmunización con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 induce una respuesta celular T CD8+ de memoria superior a su contraparte, los animales inmunizados con OVA/CpG-ODN, (que también generan una buena expansión de células de memoria), podrían enfrentar la infección de todas formas y lograr su resolución. Por lo tanto, finalizamos con un ensayo de sobrevivencia en donde los animales inmunizados con las diferentes estrategias adyuvantes son enfrentados a una dosis letal de *LM*-OVA durante la fase de memoria. Si bien, por cuestiones que exceden a este trabajo, no logramos aun repetir el ensayo con un número mayor de animales, podemos observar un resultado muy contundente en el que, con esa dosis, los únicos animales capaces de sobrevivir a la infección son aquellos inmunizados con OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 mientras que

aquellos inmunizados con OVA/CpG-ODN no logran resolver la infección y mueren 5 días después **(Fig. 3.8)**.

Con estos resultados cerramos el último capítulo de la tesis demostrando que la estrategia de formulación del CpG-ODN en el coagel es capaz de potenciar la respuesta de células T CD8+ de memoria en magnitud y calidad ofreciendo una respuesta protectora a largo plazo significativamente superior a la ofrecida por la inmunización con el CpG-ODN soluble como adyuvante.

En resumen, en este trabajo de tesis continuamos caracterizando y demostrando el potencial de esta nueva estrategia adyuvante, CpG-ODN/Coa-ASC16, intentando adicionalmente proveer información que nos ayude a entender los mecanismos por los cuáles funciona. Hemos demostrado su capacidad para generar una respuesta humoral de mayor calidad e indagado sobre algunas de las posibles vías de señalización involucradas. Por otro lado, hemos mostrado el potencial de esta estrategia para inducir una respuesta celular T CD8+ protectora tanto en la fase efectora como en la fase de memoria. Así mismo, se ha evaluado la participación de algunas vías de señalización involucradas en la generación de la respuesta de células T CD8+ efectora, la cual posteriormente sin duda tendrá efecto sobre la producción de memoria. Es importante destacar que ambas respuestas, tanto humoral como celular han sido demostradas utilizando una sola inmunización sobrepasando un desafío importante en el diseño de adyuvantes actuales. Creemos que los resultados obtenidos en este trabajo son sumamente prometedores y que esta novedosa estrategia adyuvante tiene un enorme potencial para su uso en el diseño de futuras vacunas. Sin embargo, aún queda un camino largo por recorrer para el entendimiento de los mecanismos involucrados en este efecto potenciador, así como en el estudio de la participación de diferentes poblaciones de la respuesta inmune. Lograr dilucidar dichos mecanismos nos dará la oportunidad de mejorar esta estrategia adyuvante e incluso adaptarla a otros antígenos. Nunca debe olvidarse que, cada adyuvante debe ser testeado para cada antígeno y que no todas las formulaciones adyuvantes funcionarán para cualquier patógeno. La obtención de una combinación antígeno/adyuvante efectiva es el mayor reto de una vacuna.

CONCLUSIÓN GENERAL

En este trabajo de tesis, hemos demostrado como la formulación del CpG-ODN con el Coa-ASC16 aumenta sustancialmente su actividad adyuvante obteniendo un efecto notable tanto sobre la magnitud y calidad de la respuesta humoral como celular frente a un antígeno proteico no particulado. El uso del Coa-ASC16 como plataforma para el CpG-ODN ha probado aportar innumerables ventajas como estrategia adyuvante permitiendo la reducción del número de inmunizaciones y dosis antigénica sin afectar su capacidad inmunoestimulante. Además, promueve la internalización celular de ambos componentes, antígeno y adyuvante hacia la misma APC sin necesidad de utilizar conjugaciones químicas.

Notablemente, esta estrategia de formulación logra inducir una respuesta celular T CD8+ efectora altamente dependiente de IFN-I e independiente de células Th. Adicionalmente, induce una respuesta de células T CD8+ de memoria con tan sólo una inmunización capaz de otorgar una protección superior a su contraparte soluble frente a una infección bacteriana intracelular.

La IL-6 ha demostrado no participar ni en la magnitud de la respuesta humoral ni en la respuesta celular T CD8+ efectora generada por la formulación OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16.

Estos resultados son altamente prometedores como un medio simple, barato y seguro para optimizar la capacidad adyuvante del CpG-ODN a considerar en el desarrollo de vacunas futuras.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron ratones hembra cepa C57BL/6 de 8-10 semanas de edad adquiridos originariamente en la Fundación Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Las cepas de ratones “knock out” *Cd8^{-/-}* e *Il-6^{-/-}*, fueron provistas por Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) y la cepa *Ifnar1^{-/-}* fue provista por M. Albert (Instituto Pasteur, París, Francia). Los ratones fueron mantenidos en el bioterio del Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC, donde dispusieron de alimento balanceado y agua ad libitum. En todo momento se respetaron los protocolos de uso de animales en acuerdo con la Guía para el Cuidado y uso de Animales de Experimentación publicada por el Consejo Canadiense de Cuidado de Animales (expediente N° A5802-01 asignado por la oficina de Bienestar de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH)). Los experimentos fueron llevados a cabo dentro de los parámetros indicados en el protocolo 907/2015 del Honorable Consejo Directivo.

Reactivos

Se utilizó como antígeno modelo a la proteína OVA de Worthington Biochemical Corp (Lakewood, NJ). Las soluciones stock de OVA y de CpG-ODN fueron preparadas en solución fisiológica estéril apirógena (0,9% NaCl) (B. Braun Medical S.A, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina). Las endotoxinas fueron removidas de la solución stock de OVA (10 mg/ml) mediante Detoxi-Gel™ Endotoxin removing columns (Thermo Scientific Scientific Inc, Buenos Aires, Argentina), teniendo en cuenta las instrucciones del fabricante. Los niveles de endotoxina determinados (en la solución de OVA 10 mg/ml) antes y después del tratamiento con las columnas fue <10 UE/ml y <1 UE/ml respectivamente, utilizando el ENDOSAFE Test. El ASC16 fue obtenido de Fluka Analytical (Milan, Italia). La solución de dextrosa 5% estéril apirógena utilizada para la preparación del coagel fue obtenida de Laboratorios Roux-Ocefa (Buenos Aires, Argentina). Se utilizó el ODN sintético no metilado identificado como CpG-ODN 1826 clase B, secuencia 5'-TCCATGACGTTCCCTGACGTT-3' sintetizado con un esqueleto fosforotioato resistente a las nucleasas (CpG-ODN (PS)) obtenido de Operon Technologies (Alameda, CA, USA). El contenido de endotoxina del CpG-ODN luego de

su reconstitución (solución stock 1 mg/ml) determinada por el test de Limulus por lisado de amebocitos (BioWhittaker Inc., Walkersville, MD, USA) fue <1 UE/ml. El CFA fue obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El péptido de OVA₂₅₇₋₂₆₄ restringido a MHC clase-I identificado como SIINFEKL, fue obtenido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La OVA fracción V obtenida de Sigma-Aldrich fue preparada en solución fisiológica estéril apirógena (0,9% NaCl) pero no fue tratada con Detoxi-Gel™ Endotoxin removing columns.

Medios de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo completo RPMI 1640 GIBCO® (Life Technologies, Buenos Aires, Argentina) suplementado con 1 % de L-alanina-L-glutamina (GlutaMAX I™, GIBCO®), 2 % de suero fetal bovino (SFB) ó 10 % de SFB (Natocor S.A), 5×10^{-5} M 2β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) y antibióticos: penicilina 100 U/ml con estreptomycin 100 µg/ml (Life Technologies). Todas las células fueron incubadas en una estufa a 37 °C, atmósfera controlada con 5 % CO₂.

Preparación de las distintas formulaciones con Coa-ASC16

El antígeno OVA y/o el CpG-ODN fueron añadidos en las proporciones adecuadas a tubos apirógenos estériles conteniendo la cantidad indicada del sólido ASC16 utilizando dextrosa apirógena estéril al 5 % como diluyente para llegar a una concentración final de ACS16 del 2% p/v (ó $4,9 \times 10^{-3}$ M). Estas dispersiones se calentaron a 80°C (CMT) a baño María durante 15 minutos, luego se las retiró del baño, se las mezcló vigorosamente por medio de un vortex y se las dejó en reposo a temperatura ambiente por 2 horas hasta la obtención de la fase coagel semisólida blanca opaca.

Inmunizaciones

Los ratones fueron inmunizados vía s.c. con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16, OVA/Coa-ASC16, CpG-ODN/Coa-ASC16 u OVA emulsificada en CFA (OVA/CFA). A excepción de las inmunizaciones con OVA/CFA (cuyo esquema de inmunización y dosis se describirán posteriormente), se utilizaron dos esquemas

diferentes de inmunización a lo largo del trabajo: en el primero, las inmunizaciones se realizaron al día 0, 7 y 14; en el segundo: se inmunizó una sola vez al día 0. Cada ratón se inmunizó con una dosis total de 250 μ l igualmente distribuida en cinco sitios: origen de la cola, lomo, región de la nuca y en ambas regiones inguinales (50 μ l/sitio). El CpG-ODN fue administrado a una dosis de 75 μ g/ratón en todos los grupos experimentales. La dosis de OVA utilizada fue de 6 μ g/ratón para todos los experimentos excepto uno en el cuál se utilizó OVA 2 μ g/ratón. La inmunización con OVA/CFA se realizó vía s.c. a los días 0, 15 y 30 utilizando una dosis de OVA (fracción V) de 60 μ g/ratón repartida en partes iguales en las regiones de la nuca, lomo y cola (0,5 ml/dosis/ratón). En los experimentos con depleción de células CD4+, se realizaron 4 inyecciones vía intraperitoneal con 100 μ g/dosis/ratón de un anticuerpo específico contra la molécula CD4 (clon GKI.5) en los días -2, -1, 0 y +2 en los ratones inmunizados al día 0. Como grupo control, los animales inmunizados fueron inyectados con un anticuerpo del mismo isotipo.

Cultivos celulares

Los bazos fueron removidos quirúrgicamente y colocados en placas bacteriológicas de 60 mm de diámetro conteniendo RPMI con antibiótico y 2 % SFB. Las suspensiones celulares se obtuvieron por disgregación mecánica seguido de tratamiento con buffer de lisis (Sigma-Aldrich) durante 5 min a temperatura ambiente para eliminar los glóbulos rojos. Luego de un lavado, las células fueron resuspendidas en medio completo (RPMI 1640, 10% SFB, 5×10^{-5} M 2 β -mercaptoetanol, 1% GlutaMAX y antibióticos: penicilina 100 U/ml con estreptomina 100 μ g/ml) y contadas utilizando Azul de Tripán como colorante. Para el análisis de citoquinas ex vivo por ELISA se utilizaron dos placas de cultivos diferentes. En los experimentos del capítulo II, para el análisis de citoquinas tras ensayos de citotoxicidad in vivo en animales *Il-6*^{-/-}, *Ifnar1*^{-/-} o en el experimento de depleción de células T CD4+, se utilizaron placas de 48 pocillos (1,2x10⁶ células/pocillo). Para el resto de los experimentos se utilizó placas de 96 pocillos fondo en U (1x10⁶ células/pocillo). Las placas fueron obtenidas de Greiner Bio One (Frickenhausen, Alemania). Posteriormente los esplenocitos fueron incubados en medio completo a 37°C, en atmósfera controlada con 5 % CO₂ con el péptido

SIINFEKL (1 µg/ml) u OVA (100 µg/ml). La producción de IFN- γ fue determinada por ELISA (IFN- γ ELISA MAX™ kit, Biolegend) en muestras de sobrenadante recolectadas luego de 72 horas del cultivo.

Para la detección de citoquinas intracelulares, las suspensiones celulares fueron cultivadas con el péptido SIINFEKL (2 µg/ml) o medio completo en placas de 96 pocillos fondo en U (3x10⁶ células/ml) simultáneamente con una mezcla de GolgiStop (0,7 µl/ml y GolgiPlug (1 µl/ml); ambos obtenidos de BD Bioscience (San Diego, CA, USA), durante 5 horas. Para la determinación de CD107a, el anticuerpo α CD107a-APC fue agregado junto con el estímulo.

Ensayos de ELISA para la determinación de anticuerpos en suero y su avidéz

Placas de 96 pocillos fondo plano fueron sensibilizadas con 100 µl de una solución con 10 µg/ml de OVA diluida en un buffer carbonato-bicarbonato pH:9,6 durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C (1µg de OVA/pocillo). Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con PBS/Tween 0,05 %, y los pocillos fueron bloqueados con 100 µl de una solución de PBS/gelatina 0,5 % durante 45 min a 37 °C en cámara húmeda. Luego de tres lavados con PBS/Tween 0,05 %, se agregaron 50 µl de las muestras de suero con diluciones seriadas en PBS/gelatina 0,5 %/Tween 0,05 %. Se incubó 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Se realizaron tres lavados y se agregó 50 µl de un anticuerpo anti-IgG (policlonal) (Sigma-Aldrich), anti-IgG1 (clon X56) o anti-IgG2a/c (clon R19-15) (ambos de Becton Dickinson Argentina SRL, Buenos Aires, Argentina), conjugados con peroxidasa, los cuales se incubaron 1 hora a 37 °C en cámara húmeda. Finalmente se realizaron tres lavados y se agregaron 50 µl de una solución de H₂O₂ y o-fenilendiamina en buffer citrato para revelar la presencia de peroxidasa. La reacción colorimétrica se frenó con 50 µl de una solución de H₂SO₄ 4N para posterior medición de la densidad óptica (DO) a 490nm en un lector de placas. Los títulos se calcularon como la última dilución de la muestra que es igual al doble del promedio de los blancos. El plasma de los animales no inmunizados no fueron reactivos a OVA.

Para evaluar la avidéz de los anticuerpos inducidos por las diferentes estrategias adyuvantes se utilizó un ensayo de titulación con KSCN. Para la realización de este

ensayo las placas de 96 pocillos “high-binding” “half-area” de fondo plano (Greiner BioOne) fueron sensibilizadas con el antígeno OVA como se describió previamente. Después de los lavados, se incubaron las muestras de suero de los distintos grupos de inmunización utilizando un título único medido previamente en una dilución tal que produjera una DO de entre 1.0 y 2.0 unidades en un ELISA estándar. Luego, las placas fueron lavadas una vez con PBS/Tween 0.05% e incubadas con 50 µl de concentraciones crecientes de KSCN (0; 0,5; 1,0; 1,5; 2 y 2,5) por 15 minutos a 37°C. Las placas fueron posteriormente lavadas tres veces con PBS/Tween 0.05%. Los anticuerpos IgG policlonales fueron detectados mediante anticuerpos anti-IgG conjugados con peroxidasa como se describió en el párrafo anterior. Las densidades ópticas de los pocillos tratados con KSCN fueron expresadas como porcentaje tomando como 100% al pocillo no tratado con KSCN. Todas las muestras fueron procesadas por duplicado.

Determinación de citoquinas mediante un ELISA sándwich

La determinación de IFN- γ se realizó mediante el Kit ELISA MAX™ siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante. Placas de 96 pocillos “high-binding” fondo plano para microtécnica fueron sensibilizadas con 25 µl de anticuerpo de captura específico para la citoquina a determinar, diluido en un buffer fosfato, durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C. Al día siguiente, los pocillos fueron bloqueados con 100 µl de buffer de bloqueo (PBS/10 % SFB) durante 60 min a temperatura ambiente. Luego de cuatro lavados con PBS/Tween 0,05 %, se agregaron 50 µl del sobrenadante de cultivo de las muestras problemas. En paralelo se realizó la curva del testigo con 50 µl de diluciones seriadas de una solución de la citoquina recombinante de concentración conocida. La placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente en shaker. Se realizaron cuatro lavados y se incubó con 50 µl de anticuerpo de detección biotinilado por 60 min a temperatura ambiente. Finalmente, se realizaron seis lavados y se agregaron 50 µl de estreptavidina marcada con peroxidasa (BD Biosciences) por 30 min. La presencia de peroxidasa fue revelada con el reactivo BD OptEIA™ TMB Substrate-Chromogen (BD Biosciences).

Citometría de flujo

Aproximadamente 1×10^6 células fueron incubadas con anticuerpos anti-CD16/CD32 (clon 2.4G2) (para bloquear la unión inespecífica de los anticuerpos a los receptores de la porción Fc de las inmunoglobulinas) más los anticuerpos monoclonales de superficie correspondientes marcados con un fluorocromo (disueltos de acuerdo a concentraciones preestablecidas en la solución *buffer* para citometría: HBSS 2 % SFB 5 mM EDTA y 0,1 % de azida sódica) durante 15 minutos a 4°C. Los lavados se realizaron con la solución *buffer*. La tinción con el tetrámero K^b-SIINFEKL-PE fue realizada siguiendo exactamente el mismo procedimiento utilizado para la marca con anticuerpos de superficie. El tetrámero K^b-SIINFEKL-PE fue obtenido por NIH Tetramer Core Facility (Atlanta, GA, USA).

Para la marca intracelular de citoquinas, las suspensiones celulares fueron marcadas con anticuerpos de superficie en la forma descrita previamente. Posteriormente, las células fueron fijadas y permeabilizadas utilizando el Kit BD Cytofix/Cytoperm™ Plus (Becton Dickinson Argentina SRL) y finalmente marcadas con anticuerpos dirigidos hacia las respectivas citoquinas intracelulares. El análisis multiparamétrico de la producción simultánea de las citoquinas intracelulares y la proteína CD107a fue realizado por el método boolean gating mediante el software FlowJo V10.

Para la tinción de superficie de células en sangre, se sembraron 50 µl de sangre de cada animal obtenida usando capilares de hematocrito heparinizados en placa de 96 pocillos fondo en V. Luego de un lavado con PBS 2% SFB se incubaron las células con 100 µl del fijador y permeabilizador Cyto Cytofix/Cytoperm™ Plus por 20 minutos con el objetivo de lisar los glóbulos rojos. Luego de dos lavados con PBS 2% SFB se realizó la marcación de superficie con los anticuerpos monoclonales correspondiente y el tetrámero K^b-SIINFEKL por 15 min a 4°C. Las células fueron luego lavadas y resuspendidas en 100µl de buffer de citometría para adquisición por el citómetro FACsCantoII.

Anticuerpos utilizados para Citometría de Flujo		
Especificidad	clon	Empresa/origen
TCR- β	H57-597	Tonbo Biosciences
CD4	RM4-5	eBiosciences
CD32/CD16	2.4G2	Hibridoma
CD8 α	53-6.7	eBiosciences
CD44	IM7	eBiosciences
CD11c	N418	Biolegend
IFN- γ	XMG1.2	eBiosciences
TNF- α	MP6-XT22	BD Biosciences
IL-2	JE56.5H4	Biolegend
CD107a	ID4B	eBiosciences

Ensayo de “uptake” in vivo

Los ratones fueron inmunizados vía s.c. al día 0 en ambas zonas inguinales con OVA/CpG-ODN u OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 utilizando OVA Alexa Fluor 647[®] (Thermo Fisher Scientific Inc) y una mezcla 50:50 de CpG-ODN 1826 Alexa Fluor 488[®] (Integrated DNA Technologies) y CpG-ODN no marcado (1,2 μ g OVA y 15 μ g CpG-ODN/sitio de inyección). Luego de 72 horas, los LNs inguinales fueron removidos e incubados en medio RPMI 1640 GIBCO[®] conteniendo colagenasa D (0,5 mg/ml) y DNasa I (0,2 mg/ml) (ambos de Roche Diagnosis, Buenos Aires, Argentina) por 45 minutos a 37[°]C. Luego, las reacciones enzimáticas fueron frenadas mediante la adición de EDTA en la concentración 6 mM. Los LNs fueron luego disgregados mecánicamente y las suspensiones celulares fueron lavadas con *buffer* de citometría. Posteriormente se contaron las suspensiones celulares con Azul de Tripán y se realizó la tinción de superficie de 1×10^6 células con anti-CD11c por 30 minutos a 37[°]C. Las células fueron luego analizadas por citometría de flujo.

Ensayo de citotoxicidad in vivo

Se prepararon suspensiones celulares de esplenocitos provenientes de animales donadores C57BL/6 singénicos no inmunizados para formar un único “pool”. La mitad

del “pool” de esplenocitos fue pulsada con 10 µg/mL del péptido SIINFEKL y marcada con una concentración alta de CFSE (1,5 µM) (población CFSE^{hi}). La otra mitad no pulsada con el péptido fue marcada con una concentración baja de CFSE (0,15 µM) (población CFSE^{lo}). Luego, las células CFSE^{hi} y CFSE^{lo} fueron mezcladas en una proporción 1:1 e inyectadas vía i.v. en animales receptores inmunizados y control (no inmunizados) (2x10⁷ células/ratón). Luego de 24 horas, los animales fueron sacrificados para la extracción del bazo y posterior procesamiento y análisis por citometría de flujo de las células marcadas con CFSE. La citotoxicidad fue expresada como porcentaje de lisis específica calculada como $[1 - (r_{\text{control}} - r_{\text{inmunizado}})] \times 100$, donde r está dado por la expresión de % CFSE^{lo}/% CFSE^{hi} de ratones control e inmunizados respectivamente. Para cada uno de los ensayos en animales “knock out” *Il-6*^{-/-}, *Cd8α*^{-/-} e *Ifnar1*^{-/-} se utilizaron ratones donadores y receptores singénicos correspondiente a la misma cepa “knock out”. Este ensayo se utilizó en animales bajo los dos esquemas de inmunización descritos previamente. Para el esquema de tres inmunizaciones, los animales inmunizados fueron inyectados con las células marcadas con CFSE al día 21 post primera inmunización. Para el esquema de una única inmunización, los animales fueron inyectados con las células marcadas al día 7 post inmunización.

PAGE en condiciones no desnaturalizantes

Se prepararon dos soluciones de OVA, CpG-ODN y OVA/CpG-ODN respetando las concentraciones finales de OVA y CpG-ODN que utilizamos en todas las inmunizaciones; esto es OVA (24 µg/ml) y CpG-ODN (300 µg/ml). Se utilizó OVA marcada con IRDye®680RD. Debido a la alta intensidad del colorante fluorescente, para el componente CpG-ODN se utilizó una mezcla de CpG-ODN 1826 5' no marcado y CpG-ODN 1826 5' IRDye® 800CW donde el CpG-ODN IRDye® 800CW representa sólo el 0.56% de la mezcla. El CpG-ODN 1826 5' IRDye® 800CW fue obtenido de Integrated DNA Technologies (San Diego, CA; USA). La OVA fue marcada con el colorante infrarrojo utilizando el Kit IRDye®680RD Microscale Labeling high MW de acuerdo con las instrucciones del fabricante (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). Previamente a la corrida electroforética, una de las soluciones de OVA, CpG-ODN y OVA/CpG-ODN fue calentada a 80°C en baño María por 15 min y luego enfriada a temperatura ambiente

imitando el procedimiento utilizado para la producción de las formulaciones con Coa-ASC16 descritas anteriormente. Luego, las muestras de OVA, CpG-ODN, OVA/CpG-ODN tratadas y no tratadas con calor se corrieron en un gel de poliacrilamida al 20% en condiciones no desnaturalizantes. El gel fue luego analizado mediante el sistema de lectura infrarroja ODYSSEY (LI-COR Biosciences).

Ensayo de Hemólisis

Se sangraron ratones C57BL/6 para hacer un “pool”. La sangre fue distribuida en una placa de 96 pocillos de fondo plano (50 µl/pocillo). La placa fue luego centrifugada para la obtención del pellet celular. Se extrajo cuidadosamente el plasma para aislar los eritrocitos. Luego se realizaron 2 lavados con buffer PBS pH 7,4. El sobrenadante fue retirado cuidadosamente y los eritrocitos fueron resuspendidos en 190 µl de buffer PBS a distintos pH (6,4; 6,8; 7,0; 7,2 y 7,4) e incubados con el agregado de 10 µl Coa-ASC16 2% durante 45 min a 37°C. Simultáneamente se incubaron eritrocitos resuspendidos en 200 µl de buffer PBS a cada pH como control. Luego, la placa fue centrifugada y el sobrenadante fue trasvasado a una placa de 96 pocillos fondo plano para su lectura colorimétrica a 540nm. Todas las muestras fueron procesadas por triplicado. El nivel de hemólisis fue expresado como porcentaje tomando como 100% al promedio de las muestras tratadas con Tritón X-100 al 20%. Los valores de DO de cada muestra tratada con Coa-ASC16 fueron obtenidos tras sustracción de los correspondientes valores de DO de las muestras sin tratar incubadas con el buffer correspondiente a cada pH.

Bacterias

Se utilizaron dos cepas de *Listeria monocytogenes* modificadas genéticamente para la expresión de OVA. Ambas cepas, “wild type” identificada como 10403 con el constructo OVA (*LM-OVA*) y 10403 deficiente de la proteína inductora de ensamblado de activa modificada para expresar OVA ($\Delta ActA$ *LM-OVA*) fueron originalmente obtenidas del laboratorio de Daniel A. Portnoy (Universidad de California, Berkeley, USA). La $\Delta ActA$ *LM-OVA* es una cepa atenuada incapaz de infectar células contiguas y por lo tanto no es letal.

Cuantificación bacteriana y modelos de infección

Ambas cepas, *LM-OVA* y $\Delta ActA$ *LM-OVA*, fueron expandidas desde una solución stock de glicerol en medio líquido infusión cerebro-corazón (BHI) (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) a 37°C durante toda la noche. La mañana siguiente, se tomó una alícuota de la solución de la bacteria en expansión para preparar 4 diluciones (1/50; 1/100; 1/200 y 1/400) en medio líquido BHI. Las diluciones fueron cultivadas con shaker por 3,5 horas a 37°C para lograr la expansión en fase logarítmica de la bacteria. Luego, las DO de las diluciones fueron medidas a 600nm y convertidas a un estimativo de la concentración bacteriana por medio de una curva estándar predeterminada. La bacteria fue diluida en PBS a la concentración requerida e inyectada vía i.v. en un volumen de 100 μ l/ratón.

Para la cepa $\Delta ActA$ *LM-OVA* se emplearon dos modelos experimentales diferentes. En el primero, para el estudio de la respuesta celular durante la fase efectora y de precursores de memoria tempranos (Figuras 2.9; 2.10 y 3.1) los animales fueron inyectados vía i.v. con 5×10^3 UFC/ratón de $\Delta ActA$ *LM-OVA* al día 7 post inmunización. En el segundo modelo diseñado para el estudio de la respuesta celular en la fase de memoria, los animales inmunizados al día 0 fueron infectados con 1×10^6 UFC/ratón de $\Delta ActA$ *LM-OVA* al día 34 post inmunización con las diferentes estrategias adyuvantes (Figuras 3.2; 3.3 y 3.5).

Para la cepa *LM-OVA* se utilizaron tres modelos experimentales con tres dosis diferentes. En el primero, los animales inmunizados con las diferentes estrategias adyuvantes y el grupo control no inmunizado fueron infectados al día 7 post inmunización con 1×10^5 UFC/ratón de *LM-OVA* (Figuras 2.12; 2.13 y 2.15). En el segundo, los animales inmunizados y control fueron infectados al día 30 post inmunización con 5×10^3 UFC/ratón de *LM-OVA* (Figura 3.7). En el tercero, los animales inmunizados y control fueron infectados con 10×10^3 UFC/ratón de *LM-OVA* 30 días post inmunización (Figura 3.8).

Para el análisis de UFC remanentes en hígado, los animales fueron sacrificados a los días descritos en los respectivos modelos para recolección del órgano en buffer PBS conteniendo el detergente no iónico Nonidet P-40 al 0,2% para romper las membranas de las células eucariotas. Los órganos fueron luego disgregados mecánicamente hasta

obtener una solución homogénea de células. Posteriormente se realizaron diluciones seriadas 1/10 y se sembró un volumen de 100 μ l de cada dilución en una placa de agar BHI conteniendo 200 μ g/ml de estreptomina. Las placas fueron luego incubadas durante 24 horas a 37°C para el recuento de UFC. El número de colonias fue presentado como \log_{10} UFC/hígado.

Ensayo de sobrevida

Ratones C57BL/6 fueron inmunizados vía s.c. con OVA/CpG-ODN, OVA/CpG-ODN/Coa-ASC16 o CpG-ODN/Coa-ASC16 al día 0 e infectados un mes después vía i.v con 10×10^3 UFC de *LM-OVA*. Los animales fueron observados diariamente hasta el día 15 días post infección, periodo en el cual los animales que sobreviven lograron resolver la infección. El porcentaje de sobrevida fue calculado con el programa GraphPad Prism 5 utilizando el método de análisis Kaplan Meier.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados se expresan como el promedio \pm SEM. Se utilizó ANOVA de una vía seguido del post test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Para comparar dos grupos se utilizó la prueba T de Student. Todas las diferencias fueron consideradas como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

SOLUCIONES

1. Soluciones *buffer*

a. Solución buffer salino de fosfatos (PBS) pH 7,2-7,4

NaCl	7,20 g
KH ₂ PO ₄	0,43 g
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	14,80 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

b. Solución salina balanceada de Hank's (HBSS)

KCl	0,40 g
KH ₂ PO ₄	0,06 g
Na ₂ HPO ₄	0,05 g
NaCl	8,00 g
Glucosa	1,00 g
H ₂ O	c.s.p. 1000 ml

2. Solución utilizada para contar células

a. Azul de Tripán

Solución A: 0,05 % de Azul de Trypan en H₂O.

Solución B: 0,425 % de NaCl en H₂O.

Solución de trabajo: 1 ml de (B) más 4 ml de (A) más 45 ml de PBS 1X.

3. Soluciones madres utilizadas en citometría de flujo

a. EDTA (Cicarrelli)

Solución 0,5 M en H₂O, pH 8.

b. *Azida sódica (Sigma-Aldrich)*

Solución 10 % en H₂O.

4. Soluciones utilizadas para mediciones de anticuerpos por ELISA

a. *Buffer carbonato pH 9,6 (Sensibilización)*

Na₂CO₃ 1,59 g

NaHCO₃ 2,93 g

H₂O c.s.p. 1000 ml

b. *Solución de lavado*

PBS con Tween 20 al 0,05%.

c. *Solución de bloqueo*

PBS con gelatina bacteriológica al 0,5 %.

d. *Solución para diluir las muestras*

PBS con gelatina bacteriológica al 0,5 % más Tween 20 al 0,05 %.

e. *Buffer fosfato-citrato (pH4,9-5,2)*

Na₂HPO₄.....7,25g

Ácido cítrico.....3,50g

H₂O.....c.s.p 1000ml

5. Soluciones utilizadas para mediciones de citoquinas por ELISA

a. *Buffer fosfato pH 9 (Sensibilización)*

Solución A: 0,1 M de Na₂HPO₄ en H₂O.

Solución B: 0,1 M de NaH₂PO₄ en H₂O.

Ajustar el pH de la solución A a pH=9 con la solución B.

b. Solución de bloqueo

PBS con SFB al 10 %. Filtrado con membrana de 0,22 μm .

c. Solución de lavado

PBS con Tween 20 al 0,05 %.

d. Solución para diluirlas muestras

PBS con SFB al 10 % más Tween 20 al 0,05 %.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Karch CP, Burkhard P. Vaccine technologies: From whole organisms to rationally designed protein assemblies. *Biochem Pharmacol.* 2016;120:1-14.
2. Siegrist C-A. 2 - Vaccine immunology A2 - Plotkin, Stanley A. In: Orenstein WA, Offit PA, editors. *Vaccines (Sixth Edition)*. London: W.B. Saunders; 2013. p. 14-32.
3. Weinberger B, Grubeck-Loebenstien B. Vaccines for the elderly. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(Supplement 5):100-8.
4. Moyer TJ, Zmolek AC, Irvine DJ. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. *J Clin Invest.* 2016;126(3):799-808.
5. Berg P, Mertz JE. Personal reflections on the origins and emergence of recombinant DNA technology. *Genetics.* 2010;184(1):9-17.
6. Coffman RL, Sher A, Seder RA. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity.* 2010;33(4):492-503.
7. Kenney RT CA. In: USA NGVNYIH, editor. *Adjuvants for the future* 2010. p. 250–62.
8. Awate S, Babiuk LA, Mutwiri G. Mechanisms of action of adjuvants. *Front Immunol.* 2013;4:114.
9. Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5(7):505-17.
10. Reed SG, Orr MT, Fox CB. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nat Med.* 2013;19(12):1597-608.
11. Apostolico Jde S, Lunardelli VA, Coirada FC, Boscardin SB, Rosa DS. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing. *J Immunol Res.* 2016;2016:1459394.
12. Chauhan N, Tiwari S, Iype T, Jain U. An overview of adjuvants utilized in prophylactic vaccine formulation as immunomodulators. *Expert Rev Vaccines.* 2017;16(5):491-502.
13. Juan Carlos Hernández López SUI. Activación y regulación del inflammasoma NLRP3 en las enfermedades infecciosas. *IATREA.* 2012;25.
14. Olive C. Pattern recognition receptors: sentinels in innate immunity and targets of new vaccine adjuvants. *Expert Rev Vaccines.* 2012;11(2):237-56.
15. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* 2011;29(17):3341-55.
16. Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure.* 2011;19(4):447-59.
17. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell.* 2010;140(6):805-20.
18. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124(4):783-801.
19. Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Muller T, Latz E, et al. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines toll-like receptor 9 activation. *Immunity.* 2008;28(3):315-23.
20. Barton GM, Kagan JC, Medzhitov R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol.* 2006;7(1):49-56.
21. Latz E, Schoenemeyer A, Visintin A, Fitzgerald KA, Monks BG, Knetter CF, et al. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol.* 2004;5(2):190-8.
22. Latz E, Verma A, Visintin A, Gong M, Sirois CM, Klein DC, et al. Ligand-induced conformational changes allosterically activate Toll-like receptor 9. *Nat Immunol.* 2007;8(7):772-9.
23. Ewald SE, Engel A, Lee J, Wang M, Bogoy M, Barton GM. Nucleic acid recognition by Toll-like receptors is coupled to stepwise processing by cathepsins and asparagine endopeptidase. *J Exp Med.* 2011;208(4):643-51.
24. Ewald SE, Lee BL, Lau L, Wickliffe KE, Shi GP, Chapman HA, et al. The ectodomain of Toll-like receptor 9 is cleaved to generate a functional receptor. *Nature.* 2008;456(7222):658-62.

25. Avalos AM, Kirak O, Oelkers JM, Pils MC, Kim YM, Ottinger M, et al. Cell-specific TLR9 trafficking in primary APCs of transgenic TLR9-GFP mice. *J Immunol.* 2013;190(2):695-702.
26. Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H. Immune cell activation by bacterial CpG-DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6. *J Exp Med.* 2000;192(4):595-600.
27. Schnare M, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R. Recognition of CpG DNA is mediated by signaling pathways dependent on the adaptor protein MyD88. *Current biology : CB.* 2000;10(18):1139-42.
28. Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A. The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor kappaB and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6). *J Exp Med.* 1998;187(12):2097-101.
29. Muzio M, Ni J, Feng P, Dixit VM. Pillars article: IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science.* 1997. 278: 1612-1615. *J Immunol.* 2013;190(1):16-9.
30. Yi AK, Krieg AM. Rapid induction of mitogen-activated protein kinases by immune stimulatory CpG DNA. *J Immunol.* 1998;161(9):4493-7.
31. Tsujimura H, Tamura T, Kong HJ, Nishiyama A, Ishii KJ, Klinman DM, et al. Toll-like receptor 9 signaling activates NF-kappaB through IFN regulatory factor-8/IFN consensus sequence binding protein in dendritic cells. *J Immunol.* 2004;172(11):6820-7.
32. Yi AK, Yoon JG, Krieg AM. Convergence of CpG DNA- and BCR-mediated signals at the c-Jun N-terminal kinase and NF-kappaB activation pathways: regulation by mitogen-activated protein kinases. *Int Immunol.* 2003;15(5):577-91.
33. Kumagai Y, Takeuchi O, Akira S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev.* 2008;60(7):795-804.
34. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(3):168-79.
35. Hayashi F, Means TK, Luster AD. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood.* 2003;102(7):2660-9.
36. Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology.* 2004;287(3):L552-8.
37. Platz J, Beisswenger C, Dalpke A, Koczulla R, Pinkenburg O, Vogelmeier C, et al. Microbial DNA induces a host defense reaction of human respiratory epithelial cells. *J Immunol.* 2004;173(2):1219-23.
38. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines.* 2011;10(4):499-511.
39. Krieg AM, YA, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995.
40. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol.* 2002;20:709-60.
41. Klinman DM, Yi AK, Beaucage SL, Conover J, Krieg AM. CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996;93(7):2879-83.
42. Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM. Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol.* 1996;157(5):1840-5.
43. Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med.* 1998;188(12):2335-42.

44. Stacey KJ, Sweet MJ, Hume DA. Macrophages ingest and are activated by bacterial DNA. *J Immunol.* 1996;157(5):2116-22.
45. Roman M, Martin-Orozco E, Goodman JS, Nguyen MD, Sato Y, Ronaghy A, et al. Immunostimulatory DNA sequences function as T helper-1-promoting adjuvants. *Nat Med.* 1997;3(8):849-54.
46. Jung J, Yi AK, Zhang X, Choe J, Li L, Choi YS. Distinct response of human B cell subpopulations in recognition of an innate immune signal, CpG DNA. *J Immunol.* 2002;169(5):2368-73.
47. Bernasconi NL, Onai N, Lanzavecchia A. A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells. *Blood.* 2003;101(11):4500-4.
48. Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(11):3388-93.
49. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2003;170(9):4465-74.
50. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1999;96(16):9305-10.
51. Jeske S, Pries R, Wollenberg B. CpG-Induced IFN-alpha production of plasmacytoid dendritic cells: time and dosage dependence and the effect of structural modifications to the CpG backbone. *Nucleic Acid Ther.* 2013;23(2):118-24.
52. Zhang H, Gao XD. Nanodelivery systems for enhancing the immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2017;70(Pt 2):935-46.
53. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *European Journal of Biochemistry.* 2003;270(8):1628-44.
54. Mutwiri GK, Nichani AK, Babiuk S, Babiuk LA. Strategies for enhancing the immunostimulatory effects of CpG oligodeoxynucleotides. *J Control Release.* 2004;97(1):1-17.
55. Krieg AM. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1184-94.
56. Hanagata N. Structure-dependent immunostimulatory effect of CpG oligodeoxynucleotides and their delivery system. *Int J Nanomedicine.* 2012;7:2181-95.
57. Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, et al. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2154-63.
58. Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM. Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol.* 2002;71(5):813-20.
59. Kerkmann M, Costa LT, Richter C, Rothenfusser S, Battiany J, Hornung V, et al. Spontaneous formation of nucleic acid-based nanoparticles is responsible for high interferon-alpha induction by CpG-A in plasmacytoid dendritic cells. *J Biol Chem.* 2005;280(9):8086-93.
60. Klein DC, Latz E, Espevik T, Stokke BT. Higher order structure of short immunostimulatory oligonucleotides studied by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy.* 2010;110(6):689-93.
61. Hartmann G, Battiany J, Poeck H, Wagner M, Kerkmann M, Lubenow N, et al. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN-alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2003;33(6):1633-41.

62. Marshall JD, Fearon K, Abbate C, Subramanian S, Yee P, Gregorio J, et al. Identification of a novel CpG DNA class and motif that optimally stimulate B cell and plasmacytoid dendritic cell functions. *J Leukoc Biol.* 2003;73(6):781-92.
63. Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, et al. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol.* 2004;34(1):251-62.
64. Samulowitz U, Weber M, Weeratna R, Uhlmann E, Noll B, Krieg AM, et al. A novel class of immune-stimulatory CpG oligodeoxynucleotides unifies high potency in type I interferon induction with preferred structural properties. *Oligonucleotides.* 2010;20(2):93-101.
65. Honda K, Ohba Y, Yanai H, Negishi H, Mizutani T, Takaoka A, et al. Spatiotemporal regulation of MyD88-IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature.* 2005;434(7036):1035-40.
66. Guiducci C, Ott G, Chan JH, Damon E, Calacsan C, Matray T, et al. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *J Exp Med.* 2006;203(8):1999-2008.
67. Okuya K, Tamura Y, Saito K, Kutomi G, Torigoe T, Hirata K, et al. Spatiotemporal regulation of heat shock protein 90-chaperoned self-DNA and CpG-oligodeoxynucleotide for type I IFN induction via targeting to static early endosome. *J Immunol.* 2010;184(12):7092-9.
68. Sasai M, Linehan MM, Iwasaki A. Bifurcation of Toll-like receptor 9 signaling by adaptor protein 3. *Science (New York, NY).* 2010;329(5998):1530-4.
69. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(6):471-84.
70. Geary RS. Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology.* 2009;5:381-91.
71. Henry SP, Beattie G, Yeh G, Chappel A, Giclas P, Mortari A, et al. Complement activation is responsible for acute toxicities in rhesus monkeys treated with a phosphorothioate oligodeoxynucleotide. *International immunopharmacology.* 2002;2(12):1657-66.
72. Galbraith WM, Hobson WC, Giclas PC, Schechter PJ, Agrawal S. Complement activation and hemodynamic changes following intravenous administration of phosphorothioate oligonucleotides in the monkey. *Antisense research and development.* 1994;4(3):201-6.
73. Henry SP, Novotny W, Leeds J, Auletta C, Kornbrust DJ. Inhibition of coagulation by a phosphorothioate oligonucleotide. *Antisense & nucleic acid drug development.* 1997;7(5):503-10.
74. Sheehan JP, Lan HC. Phosphorothioate oligonucleotides inhibit the intrinsic tenase complex. *Blood.* 1998;92(5):1617-25.
75. Hasegawa K, Hayashi T. Synthetic CpG oligodeoxynucleotides accelerate the development of lupus nephritis during preactive phase in NZB x NZWF1 mice. *LUPUS.* 2003;12(11):838-45.
76. Ichikawa HT, Williams LP, Segal BM. Activation of APCs through CD40 or Toll-like receptor 9 overcomes tolerance and precipitates autoimmune disease. *J Immunol.* 2002;169(5):2781-7.
77. Obermeier F, Dunger N, Deml L, Herfarth H, Scholmerich J, Falk W. CpG motifs of bacterial DNA exacerbate colitis of dextran sulfate sodium-treated mice. *Eur J Immunol.* 2002;32(7):2084-92.
78. Boccaccio GL, Mor F, Steinman L. Non-coding plasmid DNA induces IFN- γ in vivo and suppresses autoimmune encephalomyelitis. *Int Immunol.* 1999;11(2):289-96.
79. Quintana FJ, Rotem A, Carmi P, Cohen IR. Vaccination with Empty Plasmid DNA or CpG Oligonucleotide Inhibits Diabetes in Nonobese Diabetic Mice: Modulation of Spontaneous 60-kDa Heat Shock Protein Autoimmunity. *The Journal of Immunology.* 2000;165(11):6148-55.
80. Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, et al. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *The Journal of Clinical Investigation.* 2004;114(2):270-9.

81. Katakura K, Lee J, Rachmilewitz D, Li G, Eckmann L, Raz E. Toll-like receptor 9-induced type I IFN protects mice from experimental colitis. *J Clin Invest*. 2005;115(3):695-702.
82. Krieg AM. Antiinfective applications of toll-like receptor 9 agonists. *Proc Am Thorac Soc*. 2007;4(3):289-94.
83. Halperin SA, Dobson S, McNeil S, Langley JM, Smith B, McCall-Sani R, et al. Comparison of the safety and immunogenicity of hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide and a licensed hepatitis B vaccine in healthy young adults. *Vaccine*. 2006;24(1):20-6.
84. Halperin SA, Van Nest G, Smith B, Abtahi S, Whiley H, Eiden JJ. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine*. 2003;21(19-20):2461-7.
85. Cooper CL, Davis HL, Angel JB, Morris ML, Elfer SM, Seguin I, et al. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS*. 2005;19(14):1473-9.
86. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, et al. CPG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol*. 2004;24(6):693-701.
87. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol*. 1998;160(6):2555-9.
88. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, et al. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *The New England journal of medicine*. 2006;355(14):1445-55.
89. Simons FE, Shikishima Y, Van Nest G, Eiden JJ, HayGlass KT. Selective immune redirection in humans with ragweed allergy by injecting Amb a 1 linked to immunostimulatory DNA. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;113(6):1144-51.
90. Krieg AM. Toll-like receptor 9 (TLR9) agonists in the treatment of cancer. *Oncogene*. 2008;27(2):161-7.
91. Appay V, Jandus C, Voelter V, Reynard S, Coupland SE, Rimoldi D, et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol*. 2006;177(3):1670-8.
92. Pashenkov M, Goess G, Wagner C, Hormann M, Jandl T, Moser A, et al. Phase II trial of a toll-like receptor 9-activating oligonucleotide in patients with metastatic melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(36):5716-24.
93. Manegold C, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Hirsh V, Albert G, et al. Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(24):3979-86.
94. Scheiermann J, Klinman DM. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*. 2014;32(48):6377-89.
95. Mutwiri G, van Drunen Littel-van den Hurk S, Babiuk LA. Approaches to enhancing immune responses stimulated by CpG oligodeoxynucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(3):226-32.
96. Hanagata N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. *Int J Nanomedicine*. 2017;12:515-31.
97. Shirota H. Recent progress concerning CpG DNA and its use as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*. 2014;13(2):299-312.

98. Krieg AM. CpG still rocks! Update on an accidental drug. *Nucleic Acid Ther.* 2012;22(2):77-89.
99. Lo Nostro P, Ninham BW, Fratoni L, Palma S, Manzo RH, Allemandi D, et al. Effect of Water Structure on the Formation of Coagels from Ascorbyl-Alkanoates. *Langmuir.* 2003;19(8):3222-8.
100. Palma S, Manzo RH, Allemandi D, Fratoni L, Lo Nostro P. Palma, S., Manzo, R. H., Allemandi, D., Fratoni, L., & Lo Nostro, P. (2002). Coagels from ascorbic acid derivatives. *Langmuir.* 2002;18(24):9219-24.
101. Benedini L, Schulz EP, Messina PV, Palma SD, Allemandi DA, Schulz PC. The ascorbyl palmitate-water system: Phase diagram and state of water. *Colloids Surf Physicochem Eng Aspects.* 2011;375(1):178-85.
102. Ullio Gamboa GV, Benedini LA, Schulz PC, Allemandi DA. Phase Behavior of Ascorbyl Palmitate Coagels Loaded with Oligonucleotides as a New Carrier for Vaccine Adjuvants. *Journal of Surfactants and Detergents.* 2016;19(4):747-57.
103. Palma S, Manzo R, Lo Nostro P, Allemandi D. Nanostructures from alkyl vitamin C derivatives (ASCn): properties and potential platform for drug delivery. *Int J Pharm.* 2007;345(1-2):26-34.
104. Rowe RC. Handbook of pharmaceutical excipients. [Place of publication not identified]: Pharmaceutical Press; 2016.
105. Wade A WP. Handbook of Pharmaceutical excipients. 3rd edition ed2000.
106. Palma SD, Ullio Gamboa G, Allemandi DA. Vitamin C based nanostructures: Potential utility in ocular and transdermal therapy. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering.* 2013;3:61-9.
107. Palma SD, Maletto B, Lo Nostro P, Manzo RH, Pistoresi-Palencia MC, Allemandi DA. Potential use of ascorbic acid-based surfactants as skin penetration enhancers. *Drug Dev Ind Pharm.* 2006;32(7):821-7.
108. Sanchez Vallecillo MF, Ullio Gamboa GV, Palma SD, Harman MF, Chiodetti AL, Moron G, et al. Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials.* 2014;35(8):2529-42.
109. Sanchez Vallecillo MF, Minguito de la Escalera MM, Aguirre MV, Ullio Gamboa GV, Palma SD, Gonzalez-Cintado L, et al. A liquid crystal of ascorbyl palmitate, used as vaccine platform, provides sustained release of antigen and has intrinsic pro-inflammatory and adjuvant activities which are dependent on MyD88 adaptor protein. *J Control Release.* 2015;214:12-22.
110. Plotkin SA. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin Vaccine Immunol.* 2010;17(7):1055-65.
111. Amanna IJ, Carlson NE, Slifka MK. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens. *The New England journal of medicine.* 2007;357(19):1903-15.
112. Chen WH, Kozlovsky BF, Effros RB, Grubeck-Loebenstien B, Edelman R, Sztein MB. Vaccination in the elderly: an immunological perspective. *Trends Immunol.* 2009;30(7):351-9.
113. Gasparini R, Pozzi T, Montomoli E, Fragapane E, Senatore F, Minutello M, et al. Increased immunogenicity of the MF59-adjuvanted influenza vaccine compared to a conventional subunit vaccine in elderly subjects. *Eur J Epidemiol.* 2001;17(2):135-40.
114. Yi AK, Chang M, Peckham DW, Krieg AM, Ashman RF. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J Immunol.* 1998;160(12):5898-906.
115. Davis HL, Weeratna R, Waldschmidt TJ, Tygrett L, Schorr J, Krieg AM. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen. *J Immunol.* 1998;160(2):870-6.
116. Liu N, Ohnishi N, Ni L, Akira S, Bacon KB. CpG directly induces T-bet expression and inhibits IgG1 and IgE switching in B cells. *Nat Immunol.* 2003;4(7):687-93.

117. He B, Qiao X, Cerutti A. CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol.* 2004;173(7):4479-91.
118. Ruprecht CR, Lanzavecchia A. Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naive B cells. *Eur J Immunol.* 2006;36(4):810-6.
119. Siegrist CA, Pihlgren M, Tougne C, Efler SM, Morris ML, AlAdhami MJ, et al. Co-administration of CpG oligonucleotides enhances the late affinity maturation process of human anti-hepatitis B vaccine response. *Vaccine.* 2004;23(5):615-22.
120. Rynkiewicz D, Rathkopf M, Sim I, Waytes AT, Hopkins RJ, Giri L, et al. Marked enhancement of the immune response to BioThrax(R) (Anthrax Vaccine Adsorbed) by the TLR9 agonist CPG 7909 in healthy volunteers. *Vaccine.* 2011;29(37):6313-20.
121. Weeratna R, Comanita L, Davis HL. CPG ODN allows lower dose of antigen against hepatitis B surface antigen in BALB/c mice. *Immunol Cell Biol.* 2003;81(1):59-62.
122. Maletto B, Ropolo A, Moron V, Pistoiresi-Palencia MC. CpG-DNA stimulates cellular and humoral immunity and promotes Th1 differentiation in aged BALB/c mice. *J Leukoc Biol.* 2002;72(3):447-54.
123. Alignani D, Maletto B, Liscovsky M, Ropolo A, Moron G, Pistoiresi-Palencia MC. Orally administered OVA/CpG-ODN induces specific mucosal and systemic immune response in young and aged mice. *J Leukoc Biol.* 2005;77(6):898-905.
124. Eto D, Lao C, DiToro D, Barnett B, Escobar TC, Kageyama R, et al. IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (Tfh) differentiation. *PLoS One.* 2011;6(3):e17739.
125. Kopf M, Herren S, Wiles MV, Pepys MB, Kosco-Vilbois MH. Interleukin 6 influences germinal center development and antibody production via a contribution of C3 complement component. *J Exp Med.* 1998;188(10):1895-906.
126. Wu Y, El Shikh ME, El Sayed RM, Best AM, Szakal AK, Tew JG. IL-6 produced by immune complex-activated follicular dendritic cells promotes germinal center reactions, IgG responses and somatic hypermutation. *Int Immunol.* 2009;21(6):745-56.
127. Kumanogoh A, Marukawa S, Kumanogoh T, Hirota H, Yoshida K, Lee IS, et al. Impairment of antigen-specific antibody production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of gp130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997;94(6):2478-82.
128. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 2014;41(4):529-42.
129. Griffiths KL, Khader SA. Novel vaccine approaches for protection against intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol.* 2014;28:58-63.
130. Joffre OP, Segura E, Savina A, Amigorena S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(8):557-69.
131. Delamarre L, Mellman I. Harnessing dendritic cells for immunotherapy. *Semin Immunol.* 2011;23(1):2-11.
132. Nierkens S, Tel J, Janssen E, Adema GJ. Antigen cross-presentation by dendritic cell subsets: one general or all sergeants? *Trends Immunol.* 2013;34(8):361-70.
133. Hoeffel G, Ripoche AC, Matheoud D, Nascimbeni M, Escriou N, Lebon P, et al. Antigen crosspresentation by human plasmacytoid dendritic cells. *Immunity.* 2007;27(3):481-92.
134. Di Pucchio T, Chatterjee B, Smed-Sorensen A, Clayton S, Palazzo A, Montes M, et al. Direct proteasome-independent cross-presentation of viral antigen by plasmacytoid dendritic cells on major histocompatibility complex class I. *Nat Immunol.* 2008;9(5):551-7.

135. Barrio MM, Abes R, Colombo M, Pizzurro G, Boix C, Roberti MP, et al. Human macrophages and dendritic cells can equally present MART-1 antigen to CD8(+) T cells after phagocytosis of gamma-irradiated melanoma cells. *PLoS One*. 2012;7(7):e40311.
136. Leiriao P, del Fresno C, Ardavin C. Monocytes as effector cells: activated Ly-6C(high) mouse monocytes migrate to the lymph nodes through the lymph and cross-present antigens to CD8+ T cells. *Eur J Immunol*. 2012;42(8):2042-51.
137. Milo I, Sapozhnikov A, Kalchenko V, Tal O, Krauthgamer R, van Rooijen N, et al. Dynamic imaging reveals promiscuous crosspresentation of blood-borne antigens to naive CD8+ T cells in the bone marrow. *Blood*. 2013;122(2):193-208.
138. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med*. 1997;186(10):1623-31.
139. Sparwasser T, Vabulas RM, Villmow B, Lipford GB, Wagner H. Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins. *Eur J Immunol*. 2000;30(12):3591-7.
140. Johnson S, Zhan Y, Sutherland RM, Mount AM, Bedoui S, Brady JL, et al. Selected Toll-like receptor ligands and viruses promote helper-independent cytotoxic T cell priming by upregulating CD40L on dendritic cells. *Immunity*. 2009;30(2):218-27.
141. Sugai T, Mori M, Nakazawa M, Ichino M, Naruto T, Kobayashi N, et al. A CpG-containing oligodeoxynucleotide as an efficient adjuvant counterbalancing the Th1/Th2 immune response in diphtheria-tetanus-pertussis vaccine. *Vaccine*. 2005;23(46-47):5450-6.
142. Wagner H. The immunogenicity of CpG-antigen conjugates. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(3):243-7.
143. Tighe H, Takabayashi K, Schwartz D, Marsden R, Beck L, Corbeil J, et al. Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity. *Eur J Immunol*. 2000;30(7):1939-47.
144. Maurer T, Heit A, Hochrein H, Ampenberger F, O'Keeffe M, Bauer S, et al. CpG-DNA aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2002;32(8):2356-64.
145. Lauvau G, Boutet M, Williams TM, Chin SS, Chorro L. Memory CD8(+) T Cells: Innate-Like Sensors and Orchestrators of Protection. *Trends Immunol*. 2016;37(6):375-85.
146. Lauvau G, Soudja SM. Mechanisms of Memory T Cell Activation and Effective Immunity. *Adv Exp Med Biol*. 2015;850:73-80.
147. Macleod MKL, Mckee AS, David A, Wang J, Mason R, Kappler JW. Vaccine adjuvants aluminum and monophosphoryl lipid A provide distinct signals to generate protective cytotoxic memory CD8 T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108(19):7914-9.
148. Cox MA, Kahan SM, Zajac AJ. Anti-viral CD8 T cells and the cytokines that they love. *Virology*. 2013;435(1):157-69.
149. Rasia M1 SM, Palma S, Manzo R, Lo Nostro P, Allemandi D. Effect of ascorbic acid based amphiphiles on human erythrocytes membrane. *Resources Clinical hemorheology and microcirculation*. 2007;36(2):133-40.
150. Mottola M, Wilke N, Benedini L, Oliveira RG, Fanani ML. Ascorbyl palmitate interaction with phospholipid monolayers: electrostatic and rheological preponderancy. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1828(11):2496-505.
151. Heit A, Schmitz F, Haas T, Busch DH, Wagner H. Antigen co-encapsulated with adjuvants efficiently drive protective T cell immunity. *Eur J Immunol*. 2007;37(8):2063-74.
152. Krishnamachari Y, Salem AK. Innovative strategies for co-delivering antigens and CpG oligonucleotides. *Adv Drug Deliv Rev*. 2009;61(3):205-17.

153. Wagner H, Heit A, Schmitz F, Bauer S. Targeting split vaccines to the endosome improves vaccination. *Curr Opin Biotechnol.* 2004;15(6):538-42.
154. Heit A, Schmitz F, O'Keeffe M, Staib C, Busch DH, Wagner H, et al. Protective CD8 T Cell Immunity Triggered by CpG-Protein Conjugates Competes with the Efficacy of Live Vaccines. *The Journal of Immunology.* 2005;174(7):4373-80.
155. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF. Cutting Edge: Type I IFNs Provide a Third Signal to CD8 T Cells to Stimulate Clonal Expansion and Differentiation. *The Journal of Immunology.* 2005;174(8):4465-9.
156. Crouse J, Kalinke U, Oxenius A. Regulation of antiviral T cell responses by type I interferons. *Nat Rev Immunol.* 2015;15(4):231-42.
157. Fuertes MB, Woo SR, Burnett B, Fu YX, Gajewski TF. Type I interferon response and innate immune sensing of cancer. *Trends Immunol.* 2013;34(2):67-73.
158. Khan SH, Badovinac VP. *Listeria monocytogenes*: a model pathogen to study antigen-specific memory CD8 T cell responses. *Semin Immunopathol.* 2015;37(3):301-10.
159. Harty JT, Badovinac VP. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(2):107-19.
160. Kaech SM, Wherry EJ. Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection. *Immunity.* 2007;27(3):393-405.
161. Williams MA, Bevan MJ. Shortening the Infectious Period Does Not Alter Expansion of CD8 T Cells but Diminishes Their Capacity to Differentiate into Memory Cells. *The Journal of Immunology.* 2004;173(11):6694-702.
162. Kaech SM, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(11):749-61.
163. Shin H, Iwasaki A. Tissue-resident memory T cells. *Immunol Rev.* 2013;255(1):165-81.
164. Rosato PC, Beura LK, Masopust D. Tissue resident memory T cells and viral immunity. *Current opinion in virology.* 2017;22:44-50.
165. Masopust D, Vezys V, Wherry EJ, Barber DL, Ahmed R. Cutting edge: gut microenvironment promotes differentiation of a unique memory CD8 T cell population. *J Immunol.* 2006;176(4):2079-83.
166. Hikono H, Kohlmeier JE, Takamura S, Wittmer ST, Roberts AD, Woodland DL. Activation phenotype, rather than central- or effector-memory phenotype, predicts the recall efficacy of memory CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2007;204(7):1625-36.
167. Bevan MJ. Helping the CD8(+) T-cell response. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):595-602.
168. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature.* 2003;421(6925):852-6.
169. Sun JC, Williams MA, Bevan MJ. CD4+ T cells are required for the maintenance, not programming, of memory CD8+ T cells after acute infection. *Nat Immunol.* 2004;5(9):927-33.
170. Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science (New York, NY).* 2003;300(5617):339-42.
171. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science (New York, NY).* 2003;300(5617):337-9.
172. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naive cells. *Nat Immunol.* 2001;2(5):415-22.
173. Pope C, Kim SK, Marzo A, Williams K, Jiang J, Shen H, et al. Organ-Specific Regulation of the CD8 T Cell Response to *Listeria monocytogenes* Infection. *The Journal of Immunology.* 2001;166(5):3402-9.

174. Badovinac VP, Porter BB, Harty JT. Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol.* 2002;3(7):619-26.
175. Cockburn IA, Chen Y-C, Overstreet MG, Lees JR, van Rooijen N, Farber DL, et al. Prolonged Antigen Presentation Is Required for Optimal CD8+ T Cell Responses against Malaria Liver Stage Parasites. *PLoS Path.* 2010;6(5):e1000877.
176. Demento SL, Cui W, Criscione JM, Stern E, Tulipan J, Kaech SM, et al. Role of sustained antigen release from nanoparticle vaccines in shaping the T cell memory phenotype. *Biomaterials.* 2012;33(19):4957-64.
177. Badovinac VP, Messingham KA, Jabbari A, Haring JS, Harty JT. Accelerated CD8+ T-cell memory and prime-boost response after dendritic-cell vaccination. *Nat Med.* 2005;11(7):748-56.
178. Richer MJ, Nolz JC, Harty JT. Pathogen-specific inflammatory milieu tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity.* 2013;38(1):140-52.
179. Starbeck-Miller GR, Xue HH, Harty JT. IL-12 and type I interferon prolong the division of activated CD8 T cells by maintaining high-affinity IL-2 signaling in vivo. *J Exp Med.* 2014;211(1):105-20.
180. Richer MJ, Pewe LL, Hancox LS, Hartwig SM, Varga SM, Harty JT. Inflammatory IL-15 is required for optimal memory T cell responses. *Journal of Clinical Investigation.* 2015;125(9):3477-90.
181. Tian Y, Cox MA, Kahan SM, Ingram JT, Bakshi RK, Zajac AJ. A Context-Dependent Role for IL-21 in Modulating the Differentiation, Distribution, and Abundance of Effector and Memory CD8 T Cell Subsets. *J Immunol.* 2016;196(5):2153-66.
182. Kaech SM, Tan JT, Wherry EJ, Konieczny BT, Surh CD, Ahmed R. Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. *Nat Immunol.* 2003;4(12):1191-8.
183. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, Hagman J, et al. Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. *Immunity.* 2007;27(2):281-95.
184. Huster KM, Busch V, Schiemann M, Linkemann K, Kerksiek KM, Wagner H, et al. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2004;101(15):5610-5.
185. Joshi NS, Kaech SM. Effector CD8 T Cell Development: A Balancing Act between Memory Cell Potential and Terminal Differentiation. *The Journal of Immunology.* 2008;180(3):1309-15.
186. Lacombe MH, Hardy MP, Rooney J, Labrecque N. IL-7 receptor expression levels do not identify CD8+ memory T lymphocyte precursors following peptide immunization. *J Immunol.* 2005;175(7):4400-7.
187. Badovinac VP, Haring JS, Harty JT. Initial T cell receptor transgenic cell precursor frequency dictates critical aspects of the CD8(+) T cell response to infection. *Immunity.* 2007;26(6):827-41.
188. Plumlee CR, Obar JJ, Colpitts SL, Jellison ER, Haining WN, Lefrancois L, et al. Early Effector CD8 T Cells Display Plasticity in Populating the Short-Lived Effector and Memory-Precursor Pools Following Bacterial or Viral Infection. *Sci Rep.* 2015;5:12264.
189. Wang Q, Tan MT, Keegan BP, Barry MA, Heffernan MJ. Time course study of the antigen-specific immune response to a PLGA microparticle vaccine formulation. *Biomaterials.* 2014;35(29):8385-93.
190. Su B, Wang J, Wang X, Jin H, Zhao G, Ding Z, et al. The effects of IL-6 and TNF-alpha as molecular adjuvants on immune responses to FMDV and maturation of dendritic cells by DNA vaccination. *Vaccine.* 2008;26(40):5111-22.

191. Yu H, Borsotti C, Schickel J-N, Zhu S, Strowig T, Eynon EE, et al. A novel humanized mouse model with significant improvement of class-switched, antigen-specific antibody production. *Blood*. 2017;129(8):959-69.
192. Chakarov S, Fazilleau N. Monocyte-derived dendritic cells promote T follicular helper cell differentiation. *EMBO Mol Med*. 2014;6(5):590-603.
193. Poholek AC, Hansen K, Hernandez SG, Eto D, Chandele A, Weinstein JS, et al. In vivo regulation of Bcl6 and T follicular helper cell development. *J Immunol*. 2010;185(1):313-26.
194. Karnowski A, Chevrier S, Belz GT, Mount A, Emslie D, D'Costa K, et al. B and T cells collaborate in antiviral responses via IL-6, IL-21, and transcriptional activator and coactivator, Oct2 and OBF-1. *J Exp Med*. 2012;209(11):2049-64.
195. Coro ES, Chang WL, Baumgarth N. Type I IFN receptor signals directly stimulate local B cells early following influenza virus infection. *J Immunol*. 2006;176(7):4343-51.
196. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity*. 2001;14(4):461-70.
197. Riteau N, Radtke AJ, Shenderov K, Mittereder L, Oland SD, Hieny S, et al. Water-in-Oil-Only Adjuvants Selectively Promote T Follicular Helper Cell Polarization through a Type I IFN and IL-6-Dependent Pathway. *J Immunol*. 2016;197(10):3884-93.
198. Foged C, Hansen J, Agger EM. License to kill: Formulation requirements for optimal priming of CD8(+) CTL responses with particulate vaccine delivery systems. *Eur J Pharm Sci*. 2012;45(4):482-91.
199. Yewdell JW. Designing CD8+ T cell vaccines: it's not rocket science (yet). *Curr Opin Immunol*. 2010;22(3):402-10.
200. Song YC, Cheng HY, Leng CH, Chiang SK, Lin CW, Chong P, et al. A novel emulsion-type adjuvant containing CpG oligodeoxynucleotides enhances CD8+ T-cell-mediated anti-tumor immunity. *J Control Release*. 2014;173:158-65.
201. Kobiyama K, Aoshi T, Narita H, Kuroda E, Hayashi M, Tetsutani K, et al. Nonagonistic Dectin-1 ligand transforms CpG into a multitask nanoparticulate TLR9 agonist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(8):3086-91.
202. Liu H, Moynihan KD, Zheng Y, Szeto GL, Li AV, Huang B, et al. Structure-based programming of lymph-node targeting in molecular vaccines. *Nature*. 2014;507(7493):519-22.
203. Korsholm KS, Hansen J, Karlsen K, Filskov J, Mikkelsen M, Lindenstrom T, et al. Induction of CD8+ T-cell responses against subunit antigens by the novel cationic liposomal CAF09 adjuvant. *Vaccine*. 2014;32(31):3927-35.
204. Andreasen SO, Christensen JE, Marker O, Thomsen AR. Role of CD40 Ligand and CD28 in Induction and Maintenance of Antiviral CD8+ Effector T Cell Responses. *The Journal of Immunology*. 2000;164(7):3689-97.
205. Vabulas RM, Pircher H, Lipford GB, Hacker H, Wagner H. CpG-DNA activates in vivo T cell epitope presenting dendritic cells to trigger protective antiviral cytotoxic T cell responses. *J Immunol*. 2000;164(5):2372-8.
206. Zaks K, Jordan M, Guth A, Sellins K, Kedl R, Izzo A, et al. Efficient Immunization and Cross-Priming by Vaccine Adjuvants Containing TLR3 or TLR9 Agonists Complexed to Cationic Liposomes. *The Journal of Immunology*. 2006;176(12):7335-45.
207. Lee IH, Kwon HK, An S, Kim D, Kim S, Yu MK, et al. Imageable antigen-presenting gold nanoparticle vaccines for effective cancer immunotherapy in vivo. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2012;51(35):8800-5.

208. Beaudette TT, Bachelder EM, Cohen JA, Obermeyer AC, Broaders KE, Fréchet JMJ, et al. In vivo studies on the effect of co-encapsulation of CpG DNA and antigen in acid-degradable microparticle vaccines. *Mol Pharm*. 2009;6(4):1160-9.
209. Kuchtey J, Chefalo PJ, Gray RC, Ramachandra L, Harding CV. Enhancement of Dendritic Cell Antigen Cross-Presentation by CpG DNA Involves Type I IFN and Stabilization of Class I MHC mRNA. *The Journal of Immunology*. 2005;175(4):2244-51.
210. de Brito C, Tomkowiak M, Ghittoni R, Caux C, Leverrier Y, Marvel J. CpG promotes cross-presentation of dead cell-associated antigens by pre-CD8 α ⁺ dendritic cells [corrected]. *J Immunol*. 2011;186(3):1503-11.
211. Salem AK. A promising CpG adjuvant-loaded nanoparticle-based vaccine for treatment of dust mite allergies. *Immunotherapy*. 2014;6(11):1161-3.
212. Mosca F, Tritto E, Muzzi A, Monaci E, Bagnoli F, Iavarone C, et al. Molecular and cellular signatures of human vaccine adjuvants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2008;105(30):10501-6.
213. Gamrekelashvili J, Ormandy LA, Heimesaat MM, Kirschning CJ, Manns MP, Korangy F, et al. Primary sterile necrotic cells fail to cross-prime CD8(+) T cells. *Oncoimmunology*. 2012;1(7):1017-26.
214. Wilson JT, Keller S, Manganiello MJ, Cheng C-CL, Opara AC, Stayton PS. pH-Responsive Nanoparticle Vaccines for Dual-Delivery of Antigens and Immunostimulatory Oligonucleotides. *Acc Nano*. 2013;7(Xx):3912-25.
215. Luo M, Wang H, Wang Z, Cai H, Lu Z, Li Y, et al. A STING-activating nanovaccine for cancer immunotherapy. *Nature Nanotechnology*. 2017;12(7):648-54.
216. Zitvogel L, Galluzzi L, Kepp O, Smyth MJ, Kroemer G. Type I interferons in anticancer immunity. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(7):405-14.
217. Le Bon A, Etchart N, Rossmann C, Ashton M, Hou S, Gewert D, et al. Cross-priming of CD8⁺ T cells stimulated by virus-induced type I interferon. *Nat Immunol*. 2003;4(10):1009-15.
218. Spadaro F, Lapenta C, Donati S, Abalsamo L, Barnaba V, Belardelli F, et al. IFN- α enhances cross-presentation in human dendritic cells by modulating antigen survival, endocytic routing, and processing. *Blood*. 2012;119(6):1407-17.
219. Savina A, Peres A, Cebrian I, Carmo N, Moita C, Hacohen N, et al. The small GTPase Rac2 controls phagosomal alkalization and antigen crosspresentation selectively in CD8(+) dendritic cells. *Immunity*. 2009;30(4):544-55.
220. Cho HJ, Hayashi T, Datta SK, Takabayashi K, Van Uden JH, Horner A, et al. IFN- Promote Priming of Antigen-Specific CD8⁺ and CD4⁺ T Lymphocytes by Immunostimulatory DNA-Based Vaccines. *The Journal of Immunology*. 2002;168(10):4907-13.
221. Gungor B, Yagci FC, Tincer G, Bayyurt B, Alpdundar E, Yildiz S, et al. CpG ODN Nanorings Induce IFN α from Plasmacytoid Dendritic Cells and Demonstrate Potent Vaccine Adjuvant Activity. *Science translational medicine*. 2014;6(235):235ra61.
222. Kerkmann M, Lochmann D, Weyermann J, Marschner A, Poeck H, Wagner M, et al. Immunostimulatory properties of CpG-oligonucleotides are enhanced by the use of protamine nanoparticles. *Oligonucleotides*. 2006;16(4):313-22.
223. Seder RA, Darrah PA, Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(4):247-58.
224. Graw F, Regoes RR. Predicting the impact of CD8⁺ T cell polyfunctionality on HIV disease progression. *J Virol*. 2014;88(17):10134-45.
225. Darrah PA, Patel DT, De Luca PM, Lindsay RW, Davey DF, Flynn BJ, et al. Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. *Nat Med*. 2007;13(7):843-50.

226. Williams MA, Tzwnik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. *Nature*. 2006;441(7095):890-3.
227. Wille-Reece U, Flynn BJ, Lore K, Koup RA, Miles AP, Saul A, et al. Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. *J Exp Med*. 2006;203(5):1249-58.
228. Saparov A, Wagner FH, Zheng R, Oliver JR, Maeda H, Hockett RD, et al. Interleukin-2 expression by a subpopulation of primary T cells is linked to enhanced memory/effector function. *Immunity*. 1999;11(3):271-80.
229. Precopio ML, Betts MR, Parrino J, Price DA, Gostick E, Ambrozak DR, et al. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med*. 2007;204(6):1405-16.
230. Shen LAZaH. Innate and adaptive immune responses to *Listeria monocytogenes*: A short overview. *Microbes Infect* 2007. 2011;4(164):Lauren A. Zenewicza and Hao Shen.
231. Lauterbach H, Kerksiek KM, Busch DH, Berto E, Bozac A, Mavromara P, et al. Protection from Bacterial Infection by a Single Vaccination with Replication-Deficient Mutant Herpes Simplex Virus Type 1. *J Virol*. 2004;78(8):4020-8.
232. Kim MT, Harty JT. Impact of Inflammatory Cytokines on Effector and Memory CD8+ T Cells. *Front Immunol*. 2014;5:295.
233. Cui W, Joshi NS, Liu Y, Meng H, Kleinstein SH, Kaech SM. TLR4 ligands lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid a differentially regulate effector and memory CD8+ T Cell differentiation. *J Immunol*. 2014;192(9):4221-32.
234. Hou S, Hyland L, Ryan KW, Portner A, Doherty PC. Virus-specific CD8+ T-cell memory determined by clonal burst size. *Nature*. 1994;369(6482):652-4.
235. Murali-Krishna K, Altman JD, Suresh M, Sourdive DJ, Zajac AJ, Miller JD, et al. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity*. 1998;8(2):177-87.
236. Busch DH, Pilip IM, Vijn S, Pamer EG. Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity*. 1998;8(3):353-62.
237. Knudsen ML, Ljungberg K, Kakoulidou M, Kostic L, Hallengard D, Garcia-Arriaza J, et al. Kinetic and phenotypic analysis of CD8+ T cell responses after priming with alphavirus replicons and homologous or heterologous booster immunizations. *J Virol*. 2014;88(21):12438-51.
238. Wirth TC, Harty JT, Badovinac VP. Modulating numbers and phenotype of CD8+ T cells in secondary immune responses. *Eur J Immunol*. 2010;40(7):1916-26.
239. Gilbert SC. T-cell-inducing vaccines - what's the future. *Immunology*. 2012;135(1):19-26.
240. Webster RG, Robinson HL. DNA vaccines: a review of developments. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy*. 1997;8(4):273-92.
241. McConkey SJ, Reece WH, Moorthy VS, Webster D, Dunachie S, Butcher G, et al. Enhanced T-cell immunogenicity of plasmid DNA vaccines boosted by recombinant modified vaccinia virus Ankara in humans. *Nat Med*. 2003;9(6):729-35.
242. Perez SA, von Hofe E, Kallinteris NL, Gritzapis AD, Peoples GE, Papamichail M, et al. A new era in anticancer peptide vaccines. *Cancer*. 2010;116(9):2071-80.
243. Nardin E. The past decade in malaria synthetic peptide vaccine clinical trials. *Human vaccines*. 2010;6(1):27-38.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

- Sanchez Vallecillo MF, Ullio Gamboa GV, Palma SD, Harman MF, Chiodetti AL, Moron G, Daniel A Allemandi, María C. Pistori-Palencia, Belkys Maletto et al. Adjuvant activity of CpG-ODN formulated as a liquid crystal. *Biomaterials*. 2014;35(8):2529-42.
- María F. Sánchez Vallecillo, María M. Minguito de la Escalera, María V. Aguirre, Gabriela V. Ullio Gamboa, Santiago D. Palma, Leticia González-Cintado, Ana L. Chiodetti, Germán Soldano, Gabriel Morón, Daniel A. Allemandi, Carlos Ardavín, María C. Pistori-Palencia Belkys A. Maletto et al. A liquid crystal of ascorbyl palmitate, used as vaccine platform, provides sustained release of antigen and has intrinsic pro-inflammatory and adjuvant activities which are dependent on MyD88 adaptor protein. *J Control Release*. 2015;214:12-22.

