

Tesis Doctoral

# Caracterización y aplicaciones de un nuevo grupo de oligonucleótidos inmunoestimulantes en humanos

Elias, Fernanda

2018

Este documento forma parte de las colecciones digitales de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the digital collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [bibliotecadigital.exactas.uba.ar](http://bibliotecadigital.exactas.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Elias, Fernanda. (2018). Caracterización y aplicaciones de un nuevo grupo de oligonucleótidos inmunoestimulantes en humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6490\\_Elias](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6490_Elias)

Cita tipo Chicago:

Elias, Fernanda. "Caracterización y aplicaciones de un nuevo grupo de oligonucleótidos inmunoestimulantes en humanos". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6490\\_Elias](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6490_Elias)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

**Caracterización y aplicaciones de un nuevo grupo de oligonucleótidos  
inmunoestimulantes en humanos.**

**Lic. Fernanda Elias**

Tesis para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área  
Química Biológica

Director de tesis: Dr. Juan Fló Díaz

Consejero de Estudios: Dr. Luis Scolaro.

Lugar de trabajo: Departamento de Química Biológica – Facultad de Ciencias  
Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires (UBA).

Buenos Aires, 2018

# Caracterización y aplicaciones de un nuevo grupo de oligonucleótidos inmunoestimulantes en humanos.

El objetivo de la presente tesis fue obtener oligonucleótidos sin motivos CpG con actividad inmunoestimulante y caracterizar su aplicación en humanos.

Luego del análisis minucioso *in vitro* de cientos de oligonucleótidos, llegamos a identificar un nuevo grupo de moléculas inmunoestimulantes sin motivos CpG en humanos que responden al motivo Py N(T/A)(T)(T)(T/G), donde Py es una C o T y N es una A, T, C o G.

El oligonucleótido ODN 504 (ODN 504), prototipo de los oligonucleótidos de la serie *PyNTTTTGT*, demostró ser efectivo, en primera instancia, como adyuvante junto a antígenos o vacunas comerciales. Sin embargo, luego de los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental de sepsis/shock séptico en ratas y en sangre periférica de individuos politraumatizados, podemos además citar una actividad inmunomoduladora del ODN 504.

En la actualidad, teniendo en cuenta las diferentes y/o múltiples actividades estudiadas y desarrolladas en nuestro laboratorio, algunas de ellas descritas en detalle en esta tesis, nosotros suponemos que los ODN's *PyNTTTTGT* simulan a una sub-familia de moléculas endógenas de ADN, es decir son moléculas DAMP's (patrones moleculares asociados al daño) las cuales se liberan durante una infección o daño y son reconocidas por el sistema inmune, el cual permanentemente está monitoreando el estado integral del mismo y acciona los mecanismos apropiados que posibilitan la restauración de la homeostasis.

En la presente tesis se exponen los resultados que llevaron al descubrimiento y reporte de algunas de las actividades de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT*, que cuestionan la idea que los oligonucleótidos inmunoestimulantes en el sistema inmune de los vertebrados provienen exclusivamente de las moléculas PAMP's (patrones moleculares asociados a los patógenos), o sus análogos artificiales.

**Palabras clave:** Sistema inmune, ODN 504, DAMP (Patrón Molecular Asociado al Daño), Inmunomodulación.

# Characterization and use in humans of a new group of immunostimulatory oligonucleotides.

The goal of this thesis was to obtain oligonucleotides without CpG motifs with immunostimulatory activity and describe their use in humans.

After a comprehensive *in vitro* analysis of hundreds of oligonucleotides, we managed to identify a new group of immunostimulant molecules without CpG motifs in humans, that correspond to the motif *Py N (T/A) (T) (T) (T/G)*, where Py is a C or T and N is a A, T, C or G.

The oligonucleotide 504 (ODN504), a prototype of oligonucleotides of a *PyNTTTTGT* series, showed to be effective firstly as adjuvant, together with antigens or commercial vaccines. However, after the results obtained with our experimental model of sepsis/septic shock in rats and in peripheral blood of patients with severe trauma, we found as well an immunomodulatory activity for the ODN504.

Taking into account the different and/or multiple activities studied and developed in our lab, some of which are described in detail in this thesis, we think that the ODN *PyNTTTTGT* simulate a sub-family of DNA endogen molecules. In other words, they are damage-associated molecular patterns (DAMP's) which are released during an infection or damage, and are recognized by the immune system, which is permanently monitoring the general status of itself and triggers the mechanisms that allow the homeostasis restoration.

In the current thesis, we present the results that led to the discovery and report of some of the activities of the oligonucleotides *PyNTTTTGT*, calling into question the concept that immunostimulant oligonucleotides within the immune system of vertebrates are originated exclusively from pathogen-associated molecular pattern (PAMP's) molecules, or their artificial analogs.

**Key words:** Immune system, ODN 504, DAMP (Damage Associated Molecular Patterns), Immunomodulation.

## **ABSTRACT.**

Nuestro grupo de trabajo descubrió una familia de oligonucleótidos que responden a la fórmula canónica *Py N (T/A) (T) (T) (T/G)*, con actividad inmunomoduladora en humanos. Por no contener “motivos CpG” en su secuencia, cuestionan el paradigma actual que sostiene que la actividad de estos oligonucleótidos se debe exclusivamente a la presencia de estos motivos que simulan al ADN bacteriano, por lo tanto son considerados moléculas PAMPs (patrones moleculares asociados a los patógenos). El ODN 504 (prototipo de oligonucleótidos de la serie *PyNTTTTGT*), demostró ser útil como adyuvante en vacunas y en diferentes patologías, en donde se evidenció un desequilibrio del microambiente inmunológico, como por ejemplo en la diabetes tipo I, en sepsis o en dolor neuropático. El ODN504 sería una molécula DAMP (patrón molecular asociado al daño), que se libera frente a un daño que provoca la pérdida de la homeostasis, y en este escenario, se activan diferentes moléculas, citoquinas y/o tipos celulares con el objetivo de restaurar la misma.

## **ABSTRACT.**

A family of oligonucleotides that correspond to the canonical *Py N (T/A) (T) (T) (T/G)* motif with immunomodulation activity in humans, was discovered by our research group. Because these oligonucleotides do not have CpG motifs, the current paradigm that affirms that their activity is exclusively credited to the presence of motifs that mimic bacterial DNA, is put under question. For that reason, they are considered pathogen-associated molecular patterns (PAMP's). The ODN504 (prototype of oligonucleotides of a *PyNTTTTGT* series), showed to be useful as adjuvant in vaccines and in different pathologies, where the immunological micro-environment is unbalanced, e.g. Type I diabetes, sepsis or neuropathic pain. The ODN504 would act as a damage-associated molecular pattern (DAMP) that is released when an injury provokes the loss of internal homeostasis. In that scenario, a variety of molecules, cytokines and cell types, are activated with the goal to restore the balance.

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Dr. Juan Fló por su ayuda incondicional a lo largo de todo mi proceso de formación profesional, tanto en la mesada de trabajo como en la discusión y análisis de resultados, y por su paciencia y permanente apoyo durante la elaboración de la presente tesis.

A mi mamá, hermano, amigos y Antú por estar siempre presentes.

Al Instituto César Milstein-Fundación Pablo Cassará por permitirme continuar y desarrollar mi vocación científica.

A Dani por ayudarme a descifrar los jeroglíficos de las interminables correcciones de mi director.

## **TRABAJOS PUBLICADOS.**

Los resultados presentados en este trabajo dieron origen a las siguientes publicaciones:

- Strong CpG Independent Immunostimulation in Humans and other Primates by Synthetic Oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT Motifs. Elias F, Fló J, Lopez RA, Zorzopulos J, Montaner A and Rodríguez JM. *Journal of Immunology*. 2003; 171: 3697-704.
- PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant Hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response. Fernanda Elias, Juan Fló, Juan M. Rodríguez, Analía De Nichilo, Ricardo A. López , Jorge Zorzopulos, Carlos Nagle, Mónica Lahoz and Alejandro Montaner. *Vaccine* 23. 2005: 3597–3603.
- Immunostimulatory PyNTTTTGT Oligodeoxynucleotides: Structural Properties and Refinement of the Active Motif. Juan M. Rodríguez, Fernanda Elias, Juan Fló, Ricardo A. López, Jorge Zorzopulos and Alejandro D. Montaner. *Oligonucleotides*. 2006; 16: 275–285.
- Addition of the immunostimulatory oligonucleotide IMT504 to a seasonal flu vaccine increases hemagglutinin antibody titers in young adult and elder rats, and expands the anti-hemagglutinin antibody repertoire. Montaner AD, Denichilo A, Rodríguez JM, Fló J, López RA, Pontoriero A, Savy V, Baumeister E, Frank R, Zorzopulos J, Elías F. *Nucleic Acid Ther* 2011; 21: 265-274
- IMT504: A New and Potent Adjuvant for Rabies Vaccines Permitting Significant Dose Sparing. Alejandro D. Montaner, Analía De Nichilo, Juan M. Rodríguez, Andrés Hernando-Insúa, Juan Fló, Ricardo A. López, Verónica Sierra, Claudio Paolazzi, Oscar Larghi, David L. Horn, Jorge Zorzopulos, Fernanda Elias. *World Journal of Vaccines*. 2012; 2: 182-188.

## ÍNDICE.

	Página.
<b>Introducción</b>	1
<b>Materiales y Métodos</b>	
1. Oligonucleótidos.	31
2. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).	31
3. Ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada.	32
4. Cultivos in vitro con oligonucleótidos para la medición de IL-6, IFN- $\alpha$ , IgM e IL-8.	32
5. ELISA (Enzyme –linked immunosorbent assay) de captura (cuantitativo).	33
6. Purificación de células dendríticas plasmacitoides (CDP) y linfocitos B (LB).	35
7. Tinción para FACS (Citometría de Flujo) en microplaca.	36
8. Animales.	38
9. Vacunas.	38
10. Inmunizaciones, cultivos y recolección de muestras en ratón.	40
11. Inmunizaciones y recolección de muestras en monos.	41
12. Inmunizaciones y recolección de muestras en ratas.	42
13. Determinación de anticuerpos por el método de Elisa Directo o Indirecto (ELISA semi-cuantitativo).	44



14. Cultivo y determinación de IFN- $\gamma$ en esplenocitos provenientes de ratas inmunizadas.	46
15. Determinación de la Protección en ratas inmunizadas con el virus de la Rabia (Desafío).	46
16. Inmunización en humanos.	47
17. Método colorimétrico para determinar la diversidad de anticuerpos producidos contra un antígeno (Evaluación de la diversidad antigénica por acción del ODN 504).	48
18. Determinación del Título de anticuerpos inhibitorios de la hemaglutinación (IHA o HIA por sus siglas en inglés hemagglutination-inhibition antibodies).	50
19. Estudio de la “Evaluación de la acción del ODN 504 en la memoria inmunológica” (Capítulo G).	52
20. Estudio de la “Evaluación de la acción del ODN 504 en Sepsis y Shock séptico” (Capítulo H).	53
21. Estudio del receptor mediante el Ensayo reporter NF $\kappa$ - $\beta$ Luciferasa en células Hek 293.	56
22. Western Blotting.	57
23. Tinción intracelular indirecta de TLR9h.	58

## Resultados

<b>Capítulo A.</b> Identificación de oligonucleótidos no-CpG con actividad inmunoestimulante <i>in vitro</i> en humanos.	59
<b>Capítulo B.</b> Evaluación del ODN 504 <i>in vitro</i> en diferentes especies animales.	93
<b>Capítulo C.</b> Evaluación de la actividad del ODN 504 como adyuvante de vacunas en monos.	103

<b>Capítulo D.</b> Evaluación del ODN 504 como adyuvante de la vacuna contra la Hepatitis A.	124
<b>Capítulo E.</b> Evaluación de la acción del ODN 504 junto a la vacuna comercial de la rabia, VeroRab®.	131
<b>Capítulo F.</b> Evaluación de la acción del ODN 504 junto a la vacuna comercial del virus de Influenza, Inflexal® V de Berna.	152
<b>Capítulo G.</b> Evaluación de la acción del ODN 504 en la memoria inmunológica.	179
<b>Capítulo H.</b> Evaluación de la acción del ODN 504 en Sepsis y Shock Séptico.	186
<b>Capítulo I.</b> Estudio del Receptor.	213
<b>Discusión.</b>	220
<b>Bibliografía.</b>	247

# *Introducción*

## Introducción

La mayoría de los organismos vivos a lo largo de su vida son infectados por una variedad de agentes patógenos.

El sistema inmune es el sistema de defensa encargado de detectarlos y desencadenar las respuestas apropiadas que llevan a su eliminación.

La inmunidad innata es un mecanismo evolutivamente antiguo y filogenéticamente conservado presente en la mayoría de los organismos multicelulares. En los vertebrados es la primera línea de defensa, pero en caso de no ser suficiente para resolver la infección, cuentan con un sistema más sofisticado: el sistema adaptativo. Este sistema discrimina las moléculas propias de las que no lo son, reconociendo específicamente los péptidos antigénicos mediante receptores presentes en la superficie de los linfocitos B y T sin procesar, o luego de ser procesados por células especializadas. La inmunidad innata, en cambio, no cuenta con esta especificidad, sin embargo se activa a diferentes niveles, por ejemplo: la piel y los epitelios de los aparatos respiratorio, digestivo y genitourinario. Los mismos representan elementos propios de la inmunidad innata que impiden el ingreso de patógenos al organismo. Estas barreras naturales no ejercen solo una acción de naturaleza pasiva, sino que contribuyen a la inmunidad antimicrobiana mediante la producción de sustancias con actividad microbiostática y microbicida. Esta respuesta, inducida como consecuencia del establecimiento de un foco infeccioso primario, involucra la activación de múltiples tipos celulares incluyendo las células dendríticas, macrófagos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos, células NK (natural killer) y células NKT (natural killer T cell). Además, los componentes humorales de la inmunidad innata como las proteínas de complemento, proteínas de unión a lipopolisacáridos o proteína C reactiva, están involucradas en la detección de los microbios. Tanto los factores humorales, como las células anteriormente mencionadas, potencian los mecanismos efectores celulares de la inmunidad adaptativa favoreciendo de esta manera la eliminación del patógeno (clearance). Estas células poseen receptores que evolucionaron para reconocer estructuras moleculares muy conservadas y presentes en grandes grupos de microorganismos, denominados PAMP's (por sus siglas en inglés pathogen associated molecular patterns, patrones moleculares asociados a los patógenos) (1).

Los receptores que reconocen a los PAMP's reciben el nombre de Receptores de Reconocimiento de Patógenos (RRP) y pueden expresarse en la superficie celular, en compartimientos intracelulares o ser secretados en los líquidos corporales (1). Podemos distinguir diferentes clases de RRP por ejemplo, receptores de tipo Toll (TLR's por sus siglas en inglés Toll-Like Receptor), RIG-I (por sus siglas en inglés

Retinoic acid-inducible gene 1)/RLRs (RIG-1-like receptor), NOD (por sus siglas en inglés Nucleotide binding and oligomerization domain)/ NLRs (por sus siglas en inglés nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptor) y receptores de ADN (ácido desoxirribonucleico) doble cadena, como por ejemplo AIM2 (por sus siglas en inglés absent in melanoma 2)/inflammasoma (2, 3).

Los receptores TLR's son los más estudiados y son homólogos al receptor Toll de *Drosophila* (mosca de la fruta), el cual fue originalmente identificado como una molécula necesaria para definir la polaridad dorsoventral durante el desarrollo embrionario de este organismo (4). Así mismo, reconocen una variedad de PAMP's derivados de patógenos microbianos como micobacterias, bacterias, virus, hongos y parásitos. Se han identificado 10 TLR en humanos y 12 en ratón. El TLR-1 a 9 se encuentra conservado en ambas especies (5).

Los receptores RIG-I junto a MDA5 (por sus siglas en inglés melanoma differentiation-associated gene 5) y LGP2 (por sus siglas en inglés laboratory of genetics and physiology 2) pertenecen a la familia RLR. Reconocen distintos tipos de ARN (ácido ribonucleico) viral y se ubican en el citoplasma celular (5,3).

Los Receptores NOD/NLR's son una familia de receptores que detectan un amplio rango de moléculas (peptidoglucanos, muramil dipéptido, cristales de ácido úrico, ARN viral, toxinas, poly I:C, luz U.V y beta glucanos). Esta familia está integrada por 23 miembros en humanos y aproximadamente 34 en ratón (5,3, 6,7).

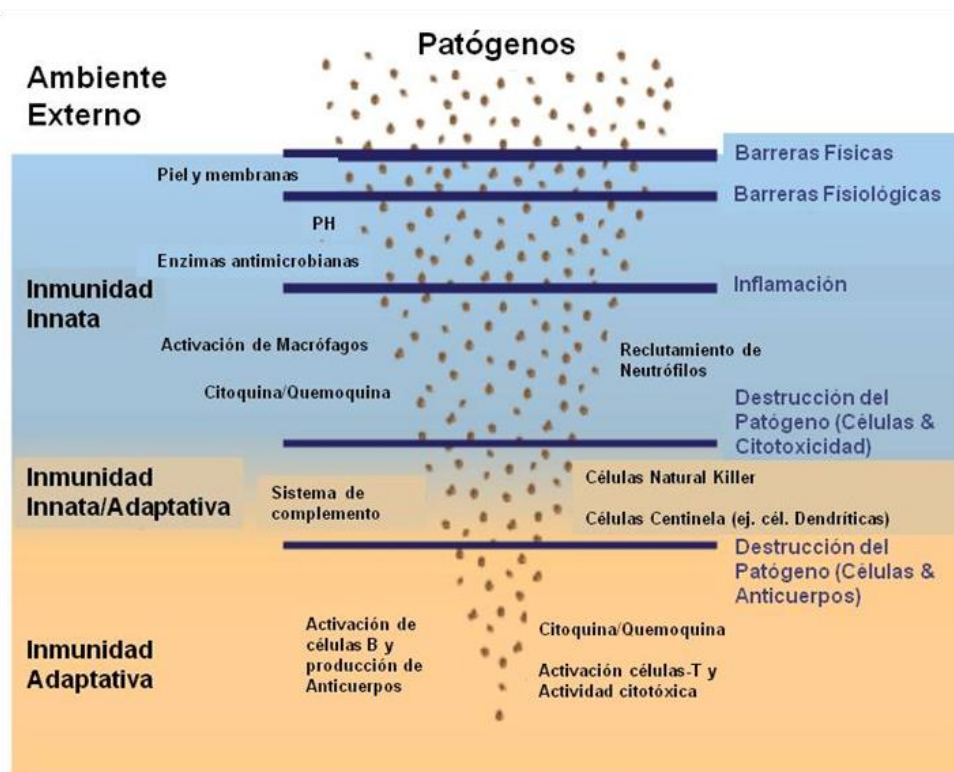
La estimulación de células inmunes como macrófagos y células dendríticas con diferentes PAMP's inducen en el citoplasma celular el ensamblado de diferentes proteínas, formando un complejo que recibe el nombre de inflammasoma, el cual está compuesto de miembros de la familia NLR (NLRP3, NLRC4, NLRP1) y AIM2 (3, 7, 8, 9). El inflammasoma se asocia a la forma inactiva de la caspasa 1 (pro-caspasa 1) y promueve su proteólisis, de esta manera se obtiene caspasa 1 que cliva los precursores de citoquinas pro IL-1 $\beta$  y pro IL-18 generando la forma activa de estas citoquinas, IL-1 $\beta$  e IL-18 respectivamente (10).

Los receptores lectina de tipo C (RLC) también forman parte de la extensa familia de receptores de la inmunidad innata, especializados en el reconocimiento de hidratos de carbono (HC) presentes en la superficie de los microorganismos. Los RLC más caracterizados son: receptores de manosa (MR CD206), DC-SIGN (CD209), DEC-205 (CD205), BCDA-2, BCDA-4, DECTIN-1 y Langerin (CD207) (11).

Sin embargo, a pesar de toda la maquinaria del sistema inmune innato, cuando un organismo patógeno avanza en el proceso de infección, las defensas producidas por el sistema innato son reforzadas por el sistema inmune adaptativo.

Los agentes de la inmunidad adaptativa específicamente atacan y destruyen al patógeno o, neutralizan sus toxinas. En un plazo de días o semanas se diseñan y producen anticuerpos a la medida del patógeno, estos anticuerpos producidos por los linfocitos B constituyen la respuesta humoral y detienen la propagación del patógeno. En paralelo a esta respuesta, se activan los linfocitos T los cuales están programados para detectar péptidos del patógeno en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad clase I/II (MHCI/II), este tipo de inmunidad recibe el nombre de inmunidad celular. A su vez, ambos interaccionan entre sí para la génesis de anticuerpos, como así también para la regulación de la respuesta inmune.

En la siguiente figura se representa un esquema del sistema inmune.



La inmunidad innata comprende varios mecanismos de protección no específica contra las infecciones, incluyendo barreras físicas y fisiológicas. Las células (por ejemplo, los macrófagos y neutrófilos) detectan y atacan a otras células que llevan PAMP's. Proteínas como citoquinas y quemoquinas señalizan la invasión del patógeno. El sistema inmune adaptativo se compone de células especializadas (por ejemplo, las células B y T) y anticuerpos que detectan y eliminan al patógeno específicamente, también utiliza citoquinas/quimoquinas para reclutar células inmunes. Se forman células B y T de memoria. El sistema del Complemento, junto con las células Natural Killer (NK) y Células Dendríticas forman un puente entre la inmunidad innata y adaptativa.

Como mencionamos anteriormente, la inmunidad innata es el mecanismo de defensa más antiguo desde el punto de vista evolutivo, ya que el mismo se encuentra representado en todos los miembros de las

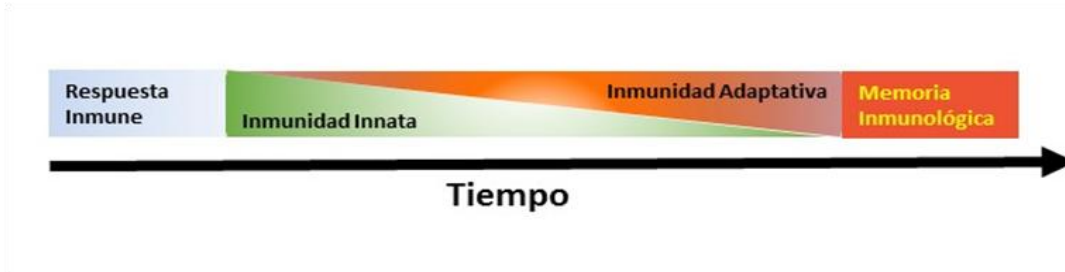
numerosas ramas filogenéticas de los invertebrados. Por su parte, la inmunidad adaptativa evolucionó mucho más tarde y solo la encontramos en los peces con mandíbula y en los vertebrados superiores (12).

Durante la evolución del sistema inmune, la inmunidad adaptativa se desarrolló en el contexto del funcionamiento del sistema inmune innato. En consecuencia, la clásica delimitación entre la inmunidad innata y la adaptativa es una división excesivamente simplificada debido a que muchas de las respuestas adaptativas se construyen sobre las bases de la inmunidad innata. Por ejemplo, la capacidad de los neutrófilos de matar a las bacterias se potencia cuando éstas son opsonizadas por anticuerpos producidos por las células B. De manera similar, el fragmento C3d el cual es generado durante el curso de la activación del complemento, actúa como un adyuvante molecular al influenciar directamente la respuesta inmune adaptativa. Específicamente, el fragmento C3d actúa como un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa uniéndose de manera covalente a un antígeno extraño, este mecanismo generalmente potencia las funciones efectoras de las células B de memoria (13). Otro ejemplo ilustrativo de la interdependencia de la inmunidad innata y adaptativa es el rol crítico que juegan las células presentadoras de antígeno (células dendríticas), estableciendo y potenciando la completa activación de las células T y B del sistema inmune adaptativo (13). Por lo dicho, resulta difícil establecer un límite definido de separación entre la inmunidad innata y la adaptativa, a esto se suma el hecho que diferentes células de la inmunidad adaptativa, como por ejemplo las células B o T regulatorias, expresan receptores del tipo Toll-like (TLR) u otros receptores que actúan en la activación de la inmunidad innata.

Debido a que esta línea de separación entre la inmunidad innata y adaptativa es difusa y no puede ser claramente definida, se puede inferir que ambos tipos de respuesta no funcionan de manera separada e independiente. Tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa, son componentes de un “sistema integrado de defensa” del huésped, en el cual numerosas células y moléculas funcionan cooperativamente. La interrelación entre la inmunidad innata y adaptativa fue expresada elocuentemente por Beutler: “... las raíces de la inmunidad adaptativa están profundamente enterradas en el suelo del sistema inmune innato” (14). Teniendo en cuenta esta vinculación entre la inmunidad innata y adaptativa, muchos autores consideraron la idea de denominarlas como subsistemas de la respuesta inmune (15).

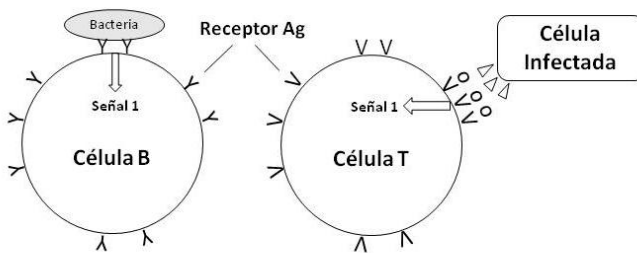
Recordemos brevemente algunas características fundamentales de la respuesta inmune. El subsistema de la inmunidad innata, si bien es considerado como la primera línea de defensa, no confiere protección a largo plazo, a diferencia del subsistema de la inmunidad adaptativa. El subsistema de la inmunidad adaptativa es altamente especializado, debido a que posee células que son capaces de

discriminar entre lo “propio” y lo “no propio” y de generar memoria inmunológica, además de aumentar su eficiencia a lo largo de la respuesta (mutación somática).



Una de las principales características de la respuesta inmune es que, durante el desarrollo de la misma, el patógeno debe ser eliminado sin destruir o dañar el tejido propio del individuo. Esto indica que el sistema inmunológico debió evolucionar bajo una fuerte presión de selección, quizá la más importante, que condujo a las células y moléculas efectoras a la necesidad crítica de poder distinguir y eliminar específicamente al patógeno. Este fue el rasgo más importante en el que se basaron los primeros modelos inmunológicos para explicar el desarrollo de la respuesta inmune.

Podemos observar como evolucionó el primer modelo inmunológico propuesto por Burnet en el año 1959-1960, el cual denominó “modelo de lo propio y lo no propio” (the self-nonself models -SNS) (16). En este modelo Burnet propuso que las células B poseen un receptor que reconoce al antígeno foráneo (no propio) de manera específica, y esta interacción es suficiente para iniciar la respuesta inmune. Este modelo establece que las células autorreactivas son eliminadas durante la ontogenia (17, 18). Más tarde, este principio también se aplicó a las células T.

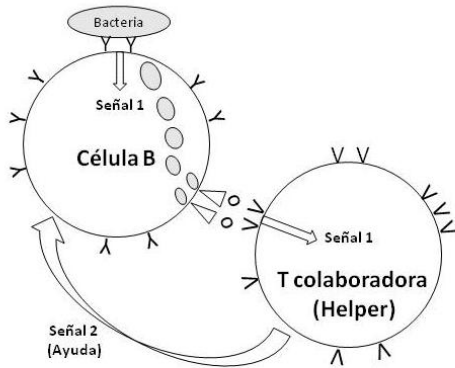


1959. Modelo Original BURNET.

En el año 1960 Burnet y Medawar compartieron el Premio Nobel de Fisiología/Medicina y de esta manera el modelo de SNS predominó hasta 1969, año en el que sufrió la primera modificación debido al descubrimiento de la hipermutación somática de los linfocitos.

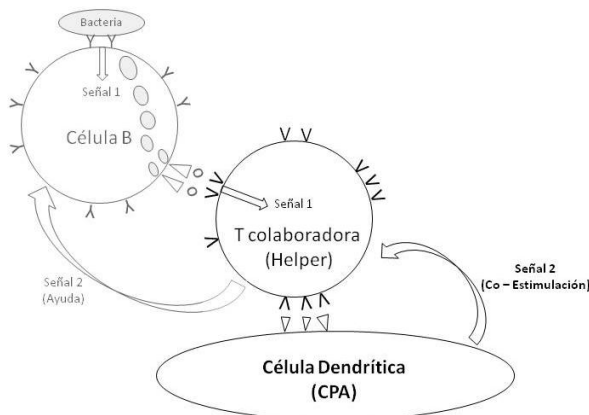


Brestcher B. y Cohn incorporan el concepto de la utilización de otro tipo de célula, las células T colaboradoras (T helper) y de una segunda señal (help), creando de esta manera el modelo de “reconocimiento asociativo”, comúnmente llamado modelo de las “dos señales (self-nonself discrimination-SNSD)” (19). Este modelo sugiere que el reconocimiento del antígeno (primera señal) conduce a la muerte de la célula B, a menos que sea rescatada oportunamente por otra célula.



1969. Primera modificación.  
Brestcher y Cohn

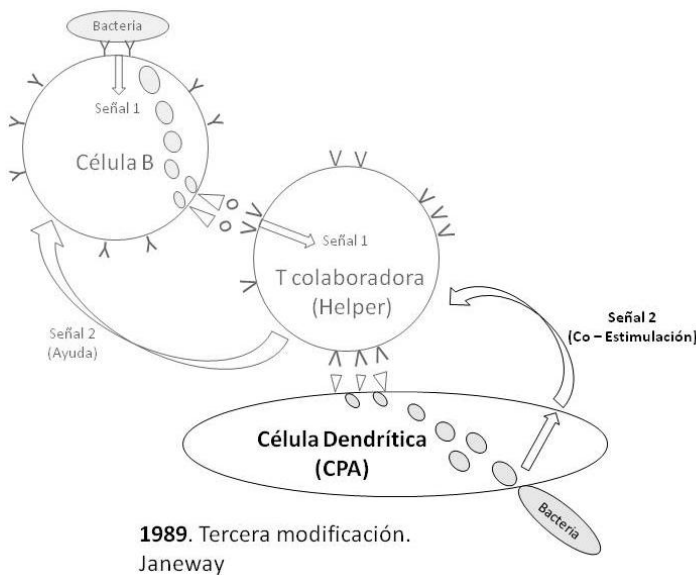
Esta versión del modelo SNSD estuvo vigente hasta el año 1974-1975 momento en que Lafferty y Cunningham propusieron que, tanto en las células T como en las células B, el reconocimiento con el antígeno no es suficiente para una completa activación. Ellos sugieren que las células T necesitan una segunda señal, a la que llamaron co-estimuladora y, esta señal es aportada por las células presentadoras de antígenos (célula dendrítica, CPA) (20).



1975. Segunda modificación.  
Lafferty y Cunningham.

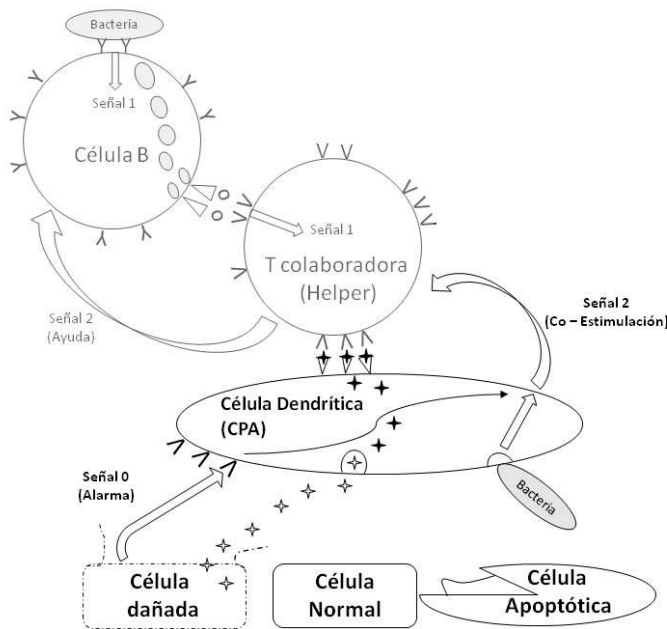
La necesidad de la co-estimulación presentó un problema fundamental para el modelo SNS ya que las CPA no presentan un receptor específico de antígeno. En consecuencia, esta modificación al modelo SNS fue desestimada o ignorada durante 15 años (21).

En el año 1989, Charlie Janeway ofreció una novedosa solución a este problema, sugirió que las CPA pueden discriminar y reconocer antígeno foráneo a través de receptores codificados en la línea germinal, los RRP antes mencionados, de esta manera las CPA pueden distinguir entre lo “infectivo no propio” y lo “no infectivo propio”. Con esta tercera modificación, Janeway propuso el modelo “Infectivo no propio (the infection-nonsel self INS)” (22, 23) manteniendo la esencia del modelo SNS.



A pesar de las diferentes modificaciones en los modelos de Burnet, Brestcher-Cohn, Lafferty-Cunningham y Janeway, todos coinciden en la misma premisa: “el sistema inmune opera para limpiar al organismo de sustancias extrañas”. Esta premisa condujo a los inmunólogos a centrar sus trabajos en el estudio de los antígenos y receptores involucrados en su reconocimiento. En otras palabras, más de 50 o 60 años fueron dedicados a estudiar lo “propio” y lo “no propio”. Sin embargo, algunas preguntas como por qué los trasplantes son rechazados, qué induce la autoinmunidad o por qué la respuesta inmune a algunos antígenos solo se desencadena con el agregado de adyuvantes como las sales de aluminio, permanecían sin respuestas.

En 1994, Polly Matzinger propuso una sugerente teoría llamada “teoría del peligro” (danger theory) (24, 25, 26, 27, 28, 29, 30). Este modelo inmunológico propone que las principales señales que actúan en el desarrollo de la respuesta inmune son endógenas y no exógenas. Estas señales son liberadas por células dañadas del propio individuo y se denominan DAMP’s (por sus siglas en inglés danger associated molecular patterns, patrones moleculares asociados al daño) o “alarminas”, y pueden ser constitutivas o inducidas, intracelulares o extracelulares o inclusive, ser parte de la matriz extracelular (24, 26).



1994. Cuarta modificación. Matzinger.

El modelo del peligro, al igual que el modelo de Janeway, asume que las CPA no se encuentran activadas constitutivamente, sino que estas células se encontrarían en un estado de reposo y serían activadas por acción de los DAMP’s (31, 25).

La activación de las CPA depende del nivel de integridad de las células vecinas o de su entorno, es decir de su medio ambiente. Si estas células se encuentran sanas o saludables no envían señales de daño y liberan a las CPA señales de calma o “tranquilizadoras” que reciben el nombre de calminas. Por el contrario, si las células de su medio ambiente se encuentran lesionadas o dañadas, éstas secretarán DAMP’s que podrían activar a las CPA de su entorno (32). En cambio, si éstas células mueren por un proceso fisiológico normal, como por ejemplo una muerte celular programada, las señales liberadas están involucradas con la activación de receptores celulares que ayudan a la eliminación de la célula muerta, por ejemplo receptores scavenger (32), en este escenario no habría inducción de moléculas co-estimuladoras

en las CPA. Este concepto indica que el mecanismo por el cual una célula muere, podría desencadenar o no la respuesta inmune. Por lo tanto, un daño o lesión del tejido puede desencadenar una respuesta innata y/o adaptativa sólo si es un indicador de peligro.

El rápido descubrimiento en ésta área de la inmunología de diferentes señales DAMP's, extracelulares (33) e intracelulares (33), respaldaron este modelo (34, 35). Por ejemplo: secuencias de ADN de mamíferos (36), ARN, HSP's (de sus siglas en inglés heat shock proteins, proteínas de shock térmico), interferón  $\alpha$ , interleuquina 1- $\beta$ , CD40-L y productos de degradación del ácido hialurónico generados cuando los vasos sanguíneos son dañados (27).

DAMP's (Extracelular)	DAMP's (Intracelular)
Acido Hialurónico	Cristales de Acido Urico
Heparán Sulfato	Cristales de Colesterol
Defensinas	HSP's
Catelicidinas LL37	ADN
HMGB1	ARN
LDL Oxidado	Proteína TXNIP
Fibronectina	Eflujo K <sup>+</sup>
Laminina	
Péptidos derivados de Colágeno	
Complejos de cromatina y ribonucleoproteínas	
$\beta$ -amiloides	
ATP Extracelular	

DAMP's=patrones moleculares asociados al daño, HSP's= proteínas de shock térmico, ADN= ácido desoxirribonucleico, ARN=ácido ribonucleico, HMGB1= High mobility group box 1 protein (proteína de grupo 1 de alta movilidad), LDL= low density lipoproteins (lipoproteínas de baja densidad), Proteína TXNIP= thioredoxin-interactive protein, ATP= adenosín tri-fosfato.

Los vertebrados y las bacterias han compartido largos tiempos evolutivos (eones), por lo tanto es lógico pensar en la existencia de receptores que respondan a ambos tipos de señales tanto endógenas como exógenas. Por ejemplo, el TLR-4 es un receptor del Lipopolisacárido bacteriano (LPS), de la proteína endógena de shock térmico Hsp70 y de productos del ácido hialurónico, y el TLR-2 es específico para lipoproteínas bacterianas y Hsp60. Los receptores NOD también pueden responder a ambos tipos de señales relacionadas con el patógeno o con señales provenientes de células dañadas (37). El receptor de lectina tipo C, MINCLE (también denominado Clec4e o Clec5f9) se expresa en macrófagos activados. MINCLE reconoce SAP130 (proteína 130 asociada al spliceosoma) el cual se transloca del núcleo al citoplasma en células necróticas (DAMP's), y también es capaz de detectar PAMP's provenientes de hongos, micobacterias o levaduras. Por lo tanto MINCLE es un receptor o sensor dual que detecta tanto ligandos propios como no propios (38, 39).

La lista de receptores, que no solo están involucrados en la detección de patógenos sino que además reconocen señales endógenas ha experimentado en los últimos años un significativo aumento (40).

Receptores	LIGANDOS	
	Exógenos (no-propios) PAMP's	Endógenos (propios) DAMP's
<b>Superficie celular</b>		
<b>TLR1 – TLR2</b>	Lipopéptidos Triacetilados (bacterias)	Lipoproteínas
<b>TLR2 – TLR6</b>	Lipopéptidos Diacetilados. (bacteria)	Lipoproteínas
<b>TLR4</b>	LPS (bacterias) Taxanos (plantas)	HMGB1, HSPs, Fibronectina, fosfolípidos oxidados, LDL oxidado Heparán sulfato
<b>TLR5</b>	Flagelina (bacteria)	
<b>Dectina 1,2</b>	β-glucano, Manano-oligosacáridos (hongos)	
<b>MINCLE</b>	Proteína nuclear (SAP130)	SAP130 (Proteína nuclear de células apoptóticas dañadas)
<b>MR</b>	Manosa (microbios)	
<b>RAGE</b>		Productos de glicosilación, HMGB1, β-amiloide
<b>CD36</b>		LDL oxidado, célula apoptótica
<b>Receptores del Complemento</b>		Productos de degradación del Sistema de Complemento
<b>FcR</b>		Fragmento Fc de Igs y complejos inmunes
<b>Endosoma</b>		
<b>TLR3</b>	ARNds (virus)	ARN propio
<b>TLR7</b>	ARNss (virus, bacteria)	ADN propio
<b>TLR-9</b>	ADN (virus, bacteria, parásitos) CpG ADN	ADN propio

PAMP's= patrones moleculares asociados a los patógenos, DAMP's=patrones moleculares asociados al daño,TLR-1/9= Toll-like receptor (receptores tipo toll), LPS= lipopolisacárido, HMGB1= High mobility group box 1 protein (proteína de grupo 1 de alta movilidad), HSPs= proteínas de shock térmico, LDL= low density lipoproteins (lipoproteínas de baja densidad), MR= mannan receptor (receptor de manosa), RAGE=receptor for advanced glycation end products (receptor para productos finales de glicosilación avanzada), CD36= cluster of differentiation 36 (cluster de diferenciación 36), FcR=Receptor para el fragmento FC de las Igs (inmunoglobulinas), ARNds=ácido ribonucleico doble cadena, ARNss=ácido ribonucleico simple cadena, ADN= ácido desoxirribonucleico, CpG ADN= ADN con motivos CpG

El concepto de que una señal de peligro puede provenir de lo propio y, en consecuencia, convertirse en una señal de alerta del sistema inmunológico, condujo a los inmunólogos a redefinir el concepto de lo “extraño” o “foráneo”. Hasta el momento, lo extraño estaba representado por un patógeno o toxina, pero teniendo en cuenta el papel que juegan los DAMP's en la activación de células inmunes y no inmunes, lo extraño o no propio no sería el único disparador en el establecimiento de la respuesta inmune.

De esta manera, una entidad foránea que no produce daño no debería desencadenar una respuesta inmune. Sin embargo, una anormalidad fisiológica causada por un daño o una injuria del tejido podría desencadenar una respuesta inmune inflamatoria, aún en ausencia de la partícula foránea, a este tipo de inflamación (la cual ocurre en ausencia de microorganismos) se la denominó inflamación estéril y se caracteriza por el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos y la producción de citoquinas proinflamatorias especialmente factor de necrosis de tumor (TNF), interleuquina-1 (IL1) y quimoquinas (41). En resumen, el modelo del peligro postula que la respuesta inmune es disparada por la necesidad de detectar y proteger al individuo de un peligro, sin distinción entre lo propio y no lo propio.

El término “peligro”, en el modelo inmunológico propuesto por Matzinger, fue simplemente una sugerencia teórica, mientras que el concepto que el “daño” o lo que se encuentra “dañado” es el desencadenante de la respuesta inmune, es un término más apropiado y además, ha dado lugar a varias investigaciones experimentales.

Bajo esta premisa, surge la necesidad de redefinir de manera funcional el universo de los antígenos. Una primera aproximación consiste en clasificarlos según estén asociados con el peligro o no. A los primeros, el sistema inmune deberá afrontarlos y a aquellos que no representen un peligro deberá tolerarlos. Según esta definición lo “propio” no necesariamente debe ser ignorado y lo “no propio” no siempre necesita ser atacado. Indudablemente, los límites de lo propio deben ser ampliados de manera tal que si lo propio necesita ser atacado, la autoreactividad deberá entrar en acción. ¿De qué manera? por ejemplo, liberando sub-poblaciones funcionalmente reactivas a lo propio es decir, células que respondan a moléculas propias pero únicamente cuando estos antígenos estén vinculados o asociados con señales de peligro. Éste es el caso de las células NKT, las células epidérmicas dendríticas (DEC's) o los linfocitos intraepiteliales (IEL's) que responder a moléculas propias expresadas por células dañadas (26).

El sistema inmune del huésped, con todos sus componentes celulares y moleculares, deberá ser lo suficientemente flexible para poder “distinguir” la procedencia del peligro. Primero, deberá determinar si hay o no peligro. En el caso que no lo hubiera, podrá incluso hasta darle la bienvenida a organismos comensales útiles, permitiendo de esta manera la entrada a oportunistas no dañinos. Por el contrario si hay peligro, deberá “evaluar” y activar los mecanismos apropiados para eliminar o minimizar la fuente de peligro.

Aunque en la actualidad el modelo del daño es aceptado por la comunidad científica, todavía hay preguntas que permanecen sin resolver. Por ejemplo, la gran mayoría de los DAMP's que han sido identificados usan los mismos RRP's que detectan PAMP's, inclusive varios DAMP's parecen tener la

habilidad de interactuar con más de un receptor. Esto conduce a preguntarnos si el hospedador trata al PAMP's y al DAMP's de la misma manera en términos de la calidad y magnitud de la respuesta. Como ya sabemos, cuando un tejido se daña no siempre se desencadena una respuesta inmune adaptativa, la cual conduciría al establecimiento de la autoinmunidad. Es sabido que las vías de señalización por diferentes TLR dan lugar a diferentes respuestas funcionales (42), por ejemplo, estudios recientes han demostrado que la HSP60 y LPS activan diferencialmente la función de las CPA vía TLR4/CD14 (43). Además, experimentos de microarreglos (microarrays) han demostrado una activación génica diferencial inflamatoria en células estimuladas con LPS o ácido hialurónico vía TLR4/CD44 y MD-2 (44). Estos datos apoyan un modelo donde la estimulación por un agente exógeno (PAMP's) o endógeno (DAMP's) activan diferentes vías (45), por lo tanto es lógico pensar que debe haber mecanismos que regulen el resultado de la respuesta en relación a los diferentes escenarios.

Estamos empezando a comprender que el sistema inmune debe trabajar para restaurar la homeostasis en el individuo, la cual se pudo haber descompensado como consecuencia de la invasión de un organismo extraño como un hongo, bacteria, virus o parásitos o, por la generación de señales de peligro/daño endógenas como por ejemplo el ácido úrico, cristales de colesterol, proteínas HSP's o ADN celular entre otros.

La respuesta inmune posee dos fases, es decir es bifásica. La primera fase está representada por la generación de una reacción inflamatoria, cuyo principal objetivo es la rápida eliminación del daño en el individuo, en esta primera fase se establece una alteración de la homeostasis. En la segunda fase se produce una respuesta adecuada para restablecer la homeostasis, por lo tanto en la misma se deben activar mecanismos reguladores específicos para detener o contener la inflamación, al mismo tiempo que se debe trabajar en la reparación del tejido dañado.

Un vez que se desencadena la primera fase indudablemente la segunda fase tiene que entrar en acción. Ahora bien, el momento en el que esta fase debe actuar es fundamental para evitar lesiones que pueden terminar siendo dañinas para el individuo. Por ejemplo, una respuesta inflamatoria sostenida en el tiempo puede originar enfermedades autoinmunes como la diabetes, esclerosis múltiple o lupus eritomatoso entre otras (46). Por el contrario, si la finalización de la inflamación aguda es temprana, existe la probabilidad de una inadecuada eliminación del microorganismo patógeno, lo cual puede conducir al establecimiento de una infección crónica.

El sistema inmune, al igual que el sistema nervioso, constituye uno de los sistemas más complejos debido a que se encuentran en constante interacción con el medio ambiente. Por lo tanto, entre ellos debe

existir una estrecha vinculación con el propósito de controlar o mantener la homeostasis en el individuo. Un claro ejemplo de ésta vinculación es el “reflejo inflamatorio”, un circuito neuronal que modula la respuesta inflamatoria previniendo la sobre-activación de citoquinas pro-inflamatorias. El “reflejo inflamatorio” está ampliamente descrito en mamíferos y también en peces teleósteos (peces óseos), específicamente en la trucha (*Oncorhynchus mykiss*) (47).

La interrelación o vinculación entre la inmunidad innata y adaptativa nos indica que el sistema inmune evolucionó para reconocer el “daño” versus el “no daño”. En este escenario y bajo la restricción de no atacar lo propio, el sistema inmune debió evolucionar para trabajar en la reparación y restauración de la homeostasis. La principal característica de los organismos sanos es la preservación de la homeostasis. Bajo esta premisa, resulta lógico pensar que diferentes moléculas internas o endógenas (sub-productos de: daño, degradación o metabolismo celular, o derivados de una infección) puedan ser utilizadas por el sistema inmune para testear la homeostasis. En este contexto, nuestro grupo de trabajo se propuso estudiar a la molécula de ADN y su rol en el sistema inmune.

A continuación, se describe una breve reseña histórica del descubrimiento de la asociación del ADN con el sistema inmune. Los primeros reportes acerca del tratamiento en enfermos de cáncer, utilizando extractos bacterianos o repetidas infecciones con bacterias tales como *Streptococcus pyogenes* y *Serratia marcescens*, se remontan a más de un siglo (48,49). Estas prácticas, extremadamente tóxicas en un principio, fueron mejoradas sensiblemente con el avance del conocimiento que permitió el subfraccionamiento y la obtención de los elementos bacterianos responsables de la acción terapéutica. Un ejemplo actual de estas prácticas terapéuticas es el uso del bacilo Calmette-Guerin (BCG) o *Mycobacterium bovis*, en el tratamiento local del cáncer de vejiga (50, 51). En los años 70, el éxito de este tratamiento del cáncer de vejiga estimuló a un grupo de investigadores a determinar cuál era el componente de la preparación de BCG responsable del efecto antitumoral. Tokunaga y colaboradores, demostraron que las fracciones de BCG que contenían ADN eran las de mayor actividad antitumoral debido a la capacidad para activar el sistema inmune innato del paciente (52, 53). El aporte de estos investigadores derivó por primera vez en el concepto de “ADN inmunoestimulante”. Así mismo, durante los primeros años de la década del 90, examinaron las fracciones de ADN provenientes de BCG, utilizando oligodeoxinucleótidos de simple cadena con ciertas secuencias conteniendo hexámeros palindrómicos. Lo que observaron fue una significativa inmunoestimulación en células de bazo de ratón y en células mononucleares de sangre periférica humana (CMSP) (54, 55).



Posteriormente se comprobó que el ADN bacteriano, y no el proveniente de vertebrados, era capaz de estimular al sistema inmune (56).

Otra de las asociaciones que vinculan al ADN con el sistema inmune, fue el aporte del descubrimiento de las vacunas ADN. En 1990, Jon Wolff (57) reportó por primera vez (en ratones Balb/c), la expresión de vectores de ADN que contenían genes para cloranfenicol, luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. Este descubrimiento, condujo rápidamente al diseño de vacunas ADN, las cuales fueron ampliamente efectivas, por ejemplo hacia el virus de la gripe (58) o HIV-1 (59). Sin embargo, las vacunas de ADN no sólo llevan la información genética para el antígeno de interés, sino que también ofrecen un efecto adyuvante debido a la presencia de ISS (de sus siglas en inglés *sequence short immunoestimulant*, secuencias inmunoestimulantes) dentro de la estructura del plásmido. Fue el grupo de Sato y colaboradores (59b) el que estableció la importancia de la presencia de secuencias palindrómicas conteniendo “secuencias o motivos CpG” como las responsables para inducir una fuerte respuesta inmune humoral y mediada por células.

En el ADN de vertebrados, la frecuencia de las secuencias CpG se encuentran severamente disminuidas y los residuos de cisteínas se encuentran metiladas. Esta diferencia estructural entre el ADN de los vertebrados y el bacteriano llevó a los investigadores a pensar que la presencia de las secuencias CpG eran las responsables del efecto inmunoestimulante observado con el ADN bacteriano. De esta manera, muchos grupos de trabajo comenzaron sus estudios sobre moléculas de ADN con efectos inmunoestimulantes.

En el año 1995, fue el trabajo de Krieg y Klinman el que estableció por primera vez que el par CpG dentro de un contexto específico de bases nucleotídicas (“motivos CpG”), era el responsable de la actividad inmunoestimulante. Según estos autores la actividad inmunoestimulante que poseían estas secuencias se perdía al invertir o metilar los pares CpG (60). La utilización de ODN's sintéticos, con motivos CpG (ODN's-CpG), de acuerdo a la hipótesis de Krieg y col., imitaban al ADN bacteriano.

Con el objetivo de disminuir la rápida degradación de estos oligonucleótidos por las nucleasas, se reemplazaron las uniones fosfodiéster (PO) por uniones fosfotioato (PS). De esta manera, debido a la facilidad para trabajar con dichas moléculas, se acumuló rápidamente un gran número de publicaciones caracterizando su actividad. Estas modificaciones químicas condujeron a la caracterización y clasificación de al menos cuatro clases de ODN's-CpG, que difieren en su estructura y actividad inmunológica: 1) Clase A (también conocido como tipo D (61)) que posee en su secuencia una región central conteniendo uno o más motivos CpG palindrómicos con uniones fosfodiéster (PO), y en los extremos 5' y 3' una cola de poly

G con uniones fosforotioato (PS), los ejemplos más conocidos son los ODN's 2216 y 2236 en humanos y ODN 1585 para ratón; 2) Clase B (conocido como tipo K (61)), son ODN que contienen todas sus uniones PS, como el ODN 2006 también conocido como PF-3512676 y CpG 7909 poseen una fuerte actividad en humanos y el ODN 1826 y 1668 son activos en ratón; 3) Clase C contiene uno o dos motivos CpG en el extremo 5' con uniones PO y, en el extremo 3' presenta una secuencia palindrómica con uniones PS, representantes de esta clase encontramos los ODN's 2395 y M362 activos en humanos y en ratón. Por último, encontramos la Clase P, esta clase de ODN presenta dos motivos CpG palindrómicos con todas sus uniones PS, representante de esta clase encontramos el ODN 2178.

Clase-A ODN 2216:

**5'-G-G-G-G-G-A-C-G-A-T-C-G-T-C-G-G-G-G-G-3'**

Clase-B ODN 2006:

**5'-T-C-G-T-C-G-T-T-T-T-G-T-C-G-T-T-T-T-G-T-C-G-T-T-3'**

Clase-C ODN 2395:

**5'-T-C-G-T-C-G-T-T-T-T-C-G-G-C-G-C-G-C-G-C-C-G-3'**

Clase-P ODN 2178:

**5'-T-C-G-T-C-G-A-C-G-A-T-C-G-G-C-G-C-G-C-G-C-C-G-3'**

Clases de oligonucleótidos CpG: El subrayado indica las secuencias palindrómicas, los guiones negros y rojos indica las uniones fosfodiéster (PO) y fosforotioato (PS) respectivamente

El estudio exhaustivo de las bases que flanquean los dinucleótidos CpG por el grupo de Krieg determinó que el motivo óptimo CpG que activa el sistema inmune de ratón o conejo responde a la fórmula general *purina-purina-CG-pirimidina-pirimidina*, siendo el mejor “motivo CpG” GACGTT (60, 62, 63). En humanos este motivo parece responder a la secuencia GTCGTT (64), el cual también es activo en diferentes especies de vertebrados como: cabra, gato, perro, oveja, caballo y gallina (62).

Como mencionamos anteriormente, la identificación de las bases flanqueantes de los dinucleótidos CpG en los extremos 5' y 3' son claves e importantes en la activación de las células del sistema inmune. Los estudios definieron que el ODN CpG con mejor actividad inmunoestimulante y poder adyuvante en humanos era el ODN CpG 2006 (65). Este ODN CpG y sus derivados son utilizados en la actualidad, como controles positivos en la mayoría de los trabajos científicos, cuando se quiere evaluar o establecer la actividad inmunoestimulante o adyuvante de alguna preparación antigénica en humanos.

Cinco años después del descubrimiento de los “motivos CpG” por Arthur Krieg y Dennis Klinman, Hemmi y colaboradores demostraron mediante la utilización de ratones knock out (TLR-9 -/-), que el TLR-9 es el receptor que reconoce el ADN bacteriano poseedor de “motivos CpG”. Los ratones TLR-9-/- no mostraron ninguna de las respuestas que se obtenían frente al ODN-CpG con ratones normales (wild type-WT), como ser la proliferación de los esplenocitos, la expresión de moléculas co-estimuladoras en la superficie de las células B, la secreción de citoquinas inflamatorias y la maduración de las células dendríticas (66).

Con el objetivo de testear oligonucleótidos con actividad inmunoestimulante en humanos, en nuestro laboratorio comenzamos a reproducir técnicas convencionales analíticas para evaluar dicha actividad. Así fue, que elegimos al ODN CpG 2006 como control positivo (también conocido como CpG 7909 y PF-3512676) debido a que era el ODN más estudiado, además de ser el prototipo de oligonucleótido clase B. Al mismo tiempo diseñamos un oligonucleótido basado en la secuencia del ODN CpG 2006 pero con todos sus pares CpG invertidos como un supuesto control negativo al que denominamos ODN 21.

ODN CpG 2006:    TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT  
ODN 21:        TGCTGCTTTTTGTGCTTTTTGTGCTT

El subrayado indica la presencia de dinucleótidos CpG.

Sorprendentemente el ODN 21 (con todos sus pares CpG invertidos) poseía actividad inmunoestimulante en células mononucleares provenientes de sangre periférica humana, CMSP o PBMC (de sus siglas en inglés Peripheral Blood Mononuclear Cells).

En su momento este resultado fue totalmente inesperado para nosotros, tanto fue así que repetimos varias veces los experimentos con oligonucleótidos sintetizados en diferentes países, es decir de distintas procedencias (Alemania, Reino Unido, Estados Unidos), con la duda que haya ocurrido un error en el proceso de síntesis del ODN 21 o estuviese mal rotulado. Sin embargo, al obtener el mismo resultado nos convencimos que podía existir la posibilidad de la existencia de otra rama de oligonucleótidos que no necesariamente debían contener dinucleótidos CpG para poseer actividad inmunoestimulante en humanos.

Cabe mencionar que en las publicaciones científicas de los diferentes grupos de investigación que lideraban el tema (de Krieg, Klinman o Hartman), cuando utilizaban oligonucleótidos como controles negativos, sustituían del par CG la C o la G por otro nucleótido, o metilaban la C. Sorprendentemente en

ninguna de las secuencias que presentaron en sus publicaciones invirtieron el par CG (60). A modo de ejemplo, se presentan algunas de las secuencias de oligonucleótidos CpG y no CpG utilizados en el trabajo de Krieg del año 1995 (60).

Oligonucleótido CpG (3M)	TCCATGT <u>CG</u> GTCCTGATGCT
Oligonucleótido no CpG (3Ma)	TCCATGCTGGTCCTGATGCT
Oligonucleótido no CpG (3Mb)	TCCATGTZGGTCCTGATGCT

El subrayado indica la presencia de dinucleótidos CG, en rojo la sustitución del nucleótido realizada, .Z indica 5-metil-citosina.

A partir de la actividad observada con el ODN 21, nuestro grupo de trabajo comenzó sus investigaciones para determinar la secuencia óptima de ODN's no-CpG (sin motivos CpG) con actividad inmunoestimulante en humanos.

Luego del análisis minucioso, *in vitro*, de cientos de oligonucleótidos fue que llegamos a identificar un nuevo grupo de moléculas inmunoestimulantes sin motivos CpG en humanos que respondían al motivo *PyNTTTTGT*.

El estudio estructural y el análisis detallado nos permitió establecer: i) el motivo responsable de la actividad inmunoestimulante en humanos; ii) la composición nucleotídica óptima del motivo; iii) el tamaño mínimo de la molécula con actividad inmunoestimulante; iv) la posición óptima del motivo y v) la constitución de nucleótidos en los extremos 5' y 3' fuera de los motivos activos (67). De esta manera para un ODN de 24 nucleótidos de longitud, su secuencia quedaría constituida de la siguiente manera:

5' N N N N Py N (T/A) (T) (T) (T/G) G T Py N (T/A) (T) (T) (T/G) G T N N N N 3'

Donde: N es una A, T, C o G.

Py es una C o T.

Entre paréntesis los nucleótidos que más influyen en la actividad inmunoestimulante.

En función de la actividad inmunoestimulante encontrada por los ODN's *PyNTTTTGT*, el siguiente objetivo fue identificar el tipo celular que responde a estos oligonucleótidos no CpG para poder inferir sus posibles aplicaciones.

En primer lugar, determinamos la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, CD40) en células mononucleares de sangre periférica CD19<sup>+</sup>. Por otro lado, se observó que la actividad inmunoestimulante de los ODN's *PyNTTTTGT* en linfocitos B purificados, es equivalente a la actividad previamente descrita en células mononucleares de sangre periférica CD19<sup>+</sup>. Este resultado demostró que

los ODNs no-CpG *PyNTTTTGT* actúan en forma directa sobre los linfocitos B. Además, estas células al ser activadas secretan inmunoglobulina de clase M (IgM), IL-6 y aumentan su proliferación. Asimismo, no observamos activación por parte de los ODN's *PyNTTTTGT* en células dendríticas mieloides (mCD; CD11c+ y CD123low). Sin embargo, cuando evaluamos la activación de la segunda población de células dendríticas, las plasmacitoides (pCD; CD11c- y CD123high.), a diferencia de lo encontrado en las mCD, aumentó la expresión de CD86/CD40 y de las moléculas que intervienen en la presentación antigénica, como los complejos mayores de histocompatibilidad I y II (MHC-I y II) (68).

Hasta aquí, estos ODN's no CpG, al igual que los ODN's CpG, mostraban un patrón biológico de activación similar al de los ODN's CpG clase B.

Debido a su capacidad de activación de células B y dendríticas, fue que pensamos que estos oligonucleótidos sin motivos CpG podrían ser utilizados como adyuvantes en vacunas.

En la actualidad, a pesar del gran éxito de las vacunas, el desarrollo de las mismas sigue siendo objeto de estudio, debido al surgimiento o presencia de nuevos patógenos emergentes o re-emergentes (patógenos antiguos). Con el fin de mejorar la protección conferida por las vacunas existentes, se busca trabajar con una menor cantidad de antígeno y/o aplicar un menor número de dosis en los individuos. Una de las estrategias más importantes en el estudio del desarrollo de nuevas vacunas, es la selección y el uso de un adyuvante adecuado.

Las sales de aluminio son los adyuvantes más utilizados en vacunas humanas. Estos aditivos se han utilizado por más de 80 años y generalmente son considerados como estimuladores de la inmunidad Th<sub>2</sub> (T helper 2) (69, 70). Hasta el año 2009 las sales de aluminio ("alúmina"), fueron los únicos adyuvantes en las vacunas para uso humano en los Estados Unidos. La alúmina es utilizada en las vacunas del virus de la Hepatitis A (VHA), virus de la Hepatitis B (VHB), virus del papiloma humano (VPH), difteria, tétanos, Haemophilus Influenzae tipo b (Hib) y meningococo (70). A pesar de considerarse poco tóxico, este adyuvante produce inflamación local que puede llevar a la formación de granulomas (71). Otros efectos que se le han atribuido al hidróxido de aluminio son la miofascitis macrofágica (MMF) (72, 73, 74) y trastornos autoinmunes (75). Los efectos secundarios reportados, han estimulado la búsqueda de nuevos adyuvantes.

Si realizamos una cronología en cuanto al desarrollo de los adyuvantes, podemos describir diferentes hallazgos científicos que en su conjunto dieron origen al estudio y evolución de una nueva generación de adyuvantes, cuyo principal objetivo es alcanzar necesidades clínicas insatisfechas previamente.

En esta línea de tiempo, podemos comenzar citando a Janeway, que en 1989 dio origen al modelo de lo infectivo no propio. En 1995, con el descubrimiento de los oligonucleótidos CpG por Krieg y Klinman se incluyó a estos motivos como molécula ilustrativa de un PAMP. En 1997, Medzhitov y Janeway descubrieron lo que hoy es el TLR-4 como receptor de la inmunidad innata y en el año 2000, Hemmi reporta al TLR-9 como receptor de los ODN's CpG. Los estudios de distintos grupos de investigación reportaron que el TLR-9 era necesario y suficiente para la actividad de los ODN's CpG (76).

Hay que tener en cuenta que, si bien el modelo inmunológico de peligro/daño propuesto por Matzinger fue presentado en 1994, transcurrieron varios años hasta que fue paulatinamente aceptado en la comunidad científica.

Una de las principales características de la respuesta inmune innata inducida por TLR-9, es el desvío y establecimiento de la respuesta T a Th<sub>1</sub> (T helper 1) (61). Además, genera una eficiente respuesta inmune humoral y celular específica del antígeno (77). Estos hallazgos científicos y su coherente relación en cuanto a la vinculación en los procesos inmunológicos, postularon a los ODN's CpG como fuertes candidatos para ser utilizados como adyuvantes en vacunas de enfermedades infecciosas (anthrax, hepatitis B, malaria, influenza), en pacientes inmunosuprimidos (HIV positivos), como moléculas antitumorales y, debido a su fuerte respuesta Th<sub>1</sub>, como candidatos en enfermedades asmáticas o alérgicas (78, 79). Se han publicado más de 600 estudios preclínicos evaluando la inmunogenicidad de diferentes vacunas con ODN's CpG, los cuales en algunos casos, describen diferencias en la naturaleza de la respuesta inducida en roedores y primates (61).

Conforme al modelo de Janeway, y los descubrimientos en el campo de la inmunología desde 1995 al 2000, fue fácil establecer en la comunidad científica el paradigma de los oligonucleótidos con “motivos CpG” y su rol en el sistema inmune de los vertebrados. Tanto fue así, que se han realizado ensayos clínicos con agonistas del TLR-9 (61).

La activación específica del TLR-9 por los ODN CpG postuló a estos oligonucleótidos como fuertes candidatos (y actualmente lo siguen siendo), para el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas. También ofrece nuevas perspectivas para disminuir las respuestas inflamatorias perjudiciales que caracterizan al asma y otras enfermedades alérgicas.

Arthur Krieg (investigador con mayor trayectoria en el tema) escribió “...el éxito del enfoque del TLR-9 y los “motivos CpG” ha conducido al resurgimiento del interés de utilizar nuevos fármacos en la inducción de la respuesta inmune innata y adaptativa con fines terapéuticos.” (77). Además, los avances en

el campo de la inmunología permitieron incluir en la lista de requisitos de los adyuvantes, la capacidad de estimular a las células presentadores de antígenos profesionales o células dendríticas (CPA).

Uno de los mecanismos de activación de las CPA, consiste en el reconocimiento de los PAMP's por parte de los RRP. Según el modelo de Janeway (modelo infectivo no propio), podemos citar por ejemplo moléculas exógenas o foráneas como: los lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gramnegativas y su derivado monofosforil lípido A (MLPA), y los oligodeonucleótidos que contienen secuencias no metiladas de ADN bacteriano (ODN CpG).

Según el modelo de Matzinger (modelo del peligro/daño), las moléculas endógenas como las proteínas de shock térmico, ácido úrico o ácidos nucleicos, entre otros, también podrían ser utilizados como adyuvantes, ya que pueden interactuar con los TL-R o con los NLR, promoviendo al igual que los PAMP's, la maduración de células dendríticas e induciendo la liberación de citoquinas pro-inflamatorias y otros mediadores que favorecen la respuesta inmune. Varios adyuvantes respaldan este modelo como las saponinas, algunas emulsiones (80) e inclusive la alúmina (81), el cual induce la liberación de moléculas como el ácido úrico y ADN que estimulan el inflammasoma NALP3 (81, 82, 83).

Vinculando ambos conceptos, podríamos pensar que naturalmente al ingresar un patógeno con sus PAMP's simultáneamente se generan DAMP's, y ambos (PAMP's y DAMP's), son reconocidos por el sistema inmunológico para mantener la homeostasis. Es decir, un PAMP's (producto de una infección) en principio podría desencadenar una respuesta inmune innata. En este escenario, es posible que el sistema haya evolucionado paralelamente para reconocer los DAMP's, ya que una infección en general provoca un daño del tejido al cual infecta y este daño genera moléculas producto de la muerte celular durante la necrosis (por ejemplo ADN, HSP's). Por lo tanto, ambas moléculas PAMP's y DAMP's juegan un rol de manera asociativa, y el monitoreo de ambos tipos de estructuras podrían mejorar la precisión en la regulación de la homeostasis del sistema inmune, ya que estaría monitoreando infección y daño tisular. En función de lo expuesto y, teniendo en cuenta que los ODN's *PyNTTTTGT* no poseen "motivos CpG", no serían moléculas PAMP's, por lo tanto fue de nuestro interés evaluar la actividad inmunoestimulante *in vivo* de estos oligonucleótidos.

Con este objetivo, previo a la evaluación *in vivo*, determinamos la actividad *in vitro* de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* en diferentes especies animales con el objetivo de seleccionar la especie respondedora a estos ODN's. En la primera especie animal que evaluamos la actividad fue en ratones de la cepa Balb/c y CF-1. Para sorpresa nuestra, no obtuvimos ni aumento en la proliferación celular, ni secreción de IL-6, ni aumento en la expresión del antígeno temprano CD69<sup>+</sup> en células CD19<sup>+</sup>. Solo los

ODN CpG presentaron una significativa actividad en ratón. Por lo tanto, a diferencia de la actividad que presentan los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* en humanos, esta clase de ODN's parecería no tener actividad en ratón.

Según la bibliografía, los primates no humanos responden de manera satisfactoria a los ODN's CpG al igual que los humanos (61). En consecuencia, evaluamos la actividad de los ODN's *PyNTTTTGT* en diferentes especies del orden Primate: *Macaca fascicularis*, *Cebus apella* y *Papio hamadryas*. Los resultados fueron satisfactorios, en todos los casos se observó un aumento en la proliferación celular en sangre periférica con dos prototipos de la serie *PyNTTTTGT* (ODN 504 y ODN 506). Si bien este resultado fue alentador, la posibilidad de trabajar con primates no humanos en el ámbito científico en nuestro país es limitada.

En forma paralela, en nuestro laboratorio se realizaba un estudio de toxicidad aguda de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* en ratas. En el mismo, se observó que luego de la inoculación del ODN 504, el bazo de estos animales incrementaba de tamaño significativamente. Esta observación nos condujo a evaluar la actividad de los ODN's *PyNTTTTGT in vitro* en estos animales. Los resultados fueron satisfactorios, el prototipo ODN 504, aumentó la proliferación y expresión de CD40<sup>+</sup> en células CD45R<sup>+</sup> (células B) provenientes de sangre periférica y esplenocitos de las cepas Sprague-Dawley y Wistar. El espectro de especies sensibles a los ODN's CpG comparada con los ODN's *PyNTTTTGT* parecía ser diferente.

Los ODN's CpG son activos en un amplio grupo de mamíferos como ratón, rata, vaca, cerdo, oveja, cabra, cobayo, primates humanos y no humanos. En cambio los ODN's *PyNTTTTGT* parecían tener actividad principalmente en primates, incluyendo humanos, y en rata.

En función de la actividad inmunoestimulante descrita de los ODN's *PyNTTTTGT* y a la posibilidad de poder trabajar con ratas y primates no humanos, el siguiente objetivo planteado por nuestro laboratorio fue testear la actividad adyuvante del ODN 504 en diferentes formulaciones antigénicas y/o vacunas comerciales. En este caso estaríamos utilizando como adyuvante, en principio, una molécula que no forma parte del grupo de los PAMP's sino de los DAMP's.

Una de las vacunas con interés de ser evaluada fue la vacuna contra el virus de la hepatitis B (VHB). El virus de VHB es un hepadnavirus que infecta principalmente a hepatocitos. La infección resultante puede conducir a una hepatitis aguda o crónica, esta última se encuentra asociada con complicaciones a largo plazo como cirrosis y carcinoma hepatocelular. En las últimas 3 (tres) décadas, la vacunación ha reducido la incidencia y en consecuencia su complicaciones. Sin embargo, el VHB sigue siendo un



problema importante en salud pública principalmente debido a individuos que responden mal a las vacunas actuales. Los esfuerzos para producir una vacuna de VHB más inmunogénica se centraron en el uso del antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg), el cual se libera en el suero luego de la infección. Por lo tanto, el HBsAg actúa como el principal componente antigénico de las vacunas del VHB.

La inmunización contra el VHB es recomendada en todo el mundo. Una serie de tres dosis a temprana edad (0, 1 y 6 meses) son necesarias para alcanzar una tasa de protección aceptable. En general, si el esquema de inmunización se completa satisfactoriamente en tiempo y en forma, se obtienen títulos protectivos hasta los 8-10 años de edad (84).

En los países sub-desarrollados el principal problema se debe a la interrupción del esquema de vacunación. Por lo tanto, el desafío sería encontrar una formulación antigénica efectiva, en la cual se requiera de un menor número de dosis, además de ser más inmunogénica.

En la actualidad, existe una formulación en hidróxido de aluminio que se aplica en adultos y niños, y otra, solo para adultos, adyuvada con el ODN CpG 1018 (Hepilisav-B (Dynavax)), que fuera recientemente aprobada (noviembre 2017) por la FDA (Food & Drug Administration U.S.), luego de ser rechazada dos veces en los últimos años.

En este contexto, es importante mencionar los antecedentes existentes en esta área de estudio. En los años 1998 y 2011 los grupos de Davis H.L. y Freed D.C obtuvieron niveles elevados de anticuerpos anti HBsAg en orangutanes (*Pongo pygmaeus*) y macaco rhesus (*Macaca mulatta*), cuando agregaron el ODN 2006 (ODN prototipo CpG, B) a la vacuna comercial Engerix<sup>®</sup> (85,86). La vacuna Engerix<sup>®</sup> fue utilizada en ensayos clínicos independientes (fase I y III) junto a dos prototipos de ODN's CpG, el 7909 (2006) y el ODN CpG 1018 (ISS 1018) con buenos resultados en cuanto al título de anticuerpos específicos (87, 88).

Durante la década pasada, GlaxoSmithKline Biological (GSKBio) (89) desarrolló un nuevo sistema de adyuvantes (AS), en el cual fueron seleccionados dos potentes inmunoestimulantes: el QS21 (saponina) y MPL (3-O-desacyl-4'-monophosphoryl lipid A), ambos componentes fueron formulados en una emulsión aceite-agua (O/W). Los resultados de una prueba clínica (fase 3) utilizando el HBsAg con el adyuvante ASO2 (prototipo AS), indujo una respuesta superior al adyuvante ODN CpG 7909. Sin embargo, se observó un alto grado de reacciones adversas en los individuos (90).

El uso de adyuvantes muy potentes constituyen un riesgo en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Por este motivo, en todas las pruebas clínicas se evalúa la presencia de marcadores de autoinmunidad, como por ejemplo del factor reumatoideo o anticuerpos anti ADN.

La especie representante de los primates no humanos elegida por nosotros, para evaluar la acción adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>, fue *Cebus apella* (91) y ratas de la especie Sprague Dawley (92).

Otra de las vacunas evaluada con el ODN 504 fue la vacuna antirrábica. La infección es causada por el virus de la rabia, familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*. Esta enfermedad es una de las más antiguas en la historia de la humanidad. En Asia, África y América del Sur mueren 55.000 personas anualmente a causa de la infección con el virus de la rabia (93, 94).

Con el objetivo de reemplazar las vacunas obtenidas en tejido nervioso de ratón, se desarrollaron vacunas en cultivos celulares, como por ejemplo la vacuna de virus inactivado purificada de células Vero (PVRV de sus siglas en inglés purified Vero cell rabies vaccine) o de células diploides humanas (HDCV de sus siglas en inglés human diploid cell rabies vaccine). Si bien estas vacunas son más seguras y eficientes que la vacuna proveniente de tejido nervioso de ratón, el costo de producción de las mismas es más elevado. Esto, sumado al oligopolio en la comercialización, lleva a que las vacunas sean prohibitivas para los países en vías de desarrollo.

Con el propósito de disminuir el riesgo de infección, la Organización Mundial de la Salud (OMS-World Health Organization-WHO) (95) recomienda un esquema de dosis particular para personas que están en contacto directo con animales silvestres, agentes de viajes, veterinarios o trabajadores de la salud de países con un alto riesgo de la enfermedad.

El esquema de inoculación consiste en llevar a cabo una serie de tres dosis iniciales al día 0 (D0), día 7 (D7) y día 21 o 28 (D28) y un refuerzo anualmente (D365). Sin embargo, en función del alto costo de las vacunas provenientes de PVRV o HDCV es muy difícil implementar de manera efectiva este esquema de inmunización. Por lo tanto, la Organización Mundial de la Salud alienta a los científicos a investigar en otras alternativas de manera de reducir el número de dosis, o la cantidad de antígeno incluido en las vacunas, con el objetivo de reducir el costo del tratamiento (95).

Con el objetivo de mejorar la vacuna de la rabia, Sanofi Pasteur realizó una prueba clínica en la cual modificaron dos factores importantes: la ruta de inoculación, intramuscular por intradérmica, y el volumen de inoculación por dosis (1mL por 0.3mL). Los resultados de esta prueba clínica fueron satisfactorios, todos los individuos alcanzaron niveles de anticuerpos seroprotectores (96).

Motivados por esta necesidad, evaluamos la actividad adyuvante del ODN 504 en ratas Sprague-Dawley utilizando diferentes dosis de la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur S.A.) con el objetivo de utilizar una menor cantidad de antígeno.

También evaluamos la acción del adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna Verorab<sup>®</sup> en una pequeña prueba piloto en humanos (97).

Debido a su relevancia epidemiológica, el siguiente agente infeccioso estudiado fue el virus de Influenza (gripe). En la actualidad la infección por el virus de influenza representa una de las principales causas de enfermedades respiratorias en el mundo, afecta a personas de todas las edades durante las estaciones de baja temperatura. Los individuos más afectados por esta enfermedad son: las personas de avanzada edad (mayores a 65 años) dado que en este grupo etario el virus de influenza representa el mayor índice de morbilidad y mortalidad (98,99), las asmáticas, las diabéticas y/o aquellas personas que por alguna enfermedad o tratamiento su sistema inmune se encuentra deprimido (99).

La mayoría de las vacunas de Influenza no contienen adyuvante y, su eficiencia podría ser mejorada por la adición de un adyuvante efectivo. Si bien las sales de aluminio son el adyuvante más utilizado, su acción parece estar limitada cuando se lo combina con el virus de Influenza (100,101). En este contexto, una variedad de adyuvantes fueron y son testeados con diferentes formulaciones de la vacuna de influenza. En la década del '50 el adyuvante de Freund Incompleto fue utilizado en la preparación de vacunas del virus de influenza en humanos (102). Los reportes indicaron que el adyuvante de Freund Incompleto aumentó los niveles de protección en los individuos, sin embargo su aplicación debió ser interrumpida por la presencia de abscesos y lesiones en el sitio de inoculación (102).

La actividad adyuvante de los ODN's CpG junto a vacunas comerciales del virus de Influenza también quedó demostrada en varios modelos animales (103, 104, 105).

La vacuna de influenza en humanos debe contener tres cepas de virus inactivado (A/H1N1-H3N2 y B) las cuales son elegidas anualmente por la Organización Mundial de la Salud y, a partir del año 1998 hasta el presente, la elección de estas cepas difiere entre el Hemisferio Norte y el Hemisferio Sur (144).

Teniendo en cuenta la capacidad de mutar del virus, uno de los más grandes desafíos radica en obtener una vacuna que confiera protección contra varias cepas.

Los principales mecanismos de mutación del virus son dos: a) "deriva antigénica", proceso por el cual se producen mutaciones puntuales que se traducen en pequeñas variaciones en la proteína madura cuando el virus se multiplica. Este mecanismo es el responsable de la aparición de variantes nuevas de los

virus de una época invernal a la siguiente, lo cual obliga a producir nuevas vacunas estacionales cada temporada; y b) el “cambio antigénico”, proceso radicalmente distinto a la “deriva antigénica”. Por este mecanismo, dos virus diferentes que entren en contacto, pueden intercambiar fragmentos del material genético que supongan la aparición de cepas totalmente diferentes, con nuevas combinaciones de subtipos de proteínas de membrana. Estos nuevos virus, si se transmiten exitosamente de persona a persona, pueden generar una pandemia. Dicho fenómeno es potencialmente peligroso, por dos razones: por una parte, porque la capacidad de transmitirse y la virulencia del nuevo virus es muy difícil de conocerse “a priori”, y por otra, porque existe el problema que la población, al tratarse de virus nuevos, no presenta inmunidad alguna frente a ellos.

En este contexto evaluamos la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial Inflexal Berna V<sup>®</sup> (Inflexal V) en ratas jóvenes adultas (6-8 semanas) y ancianas (18-22 meses) de la cepa Sprague-Dawley. La vacuna Inflexal V es una vacuna virosomal en donde las proteínas Hemaglutinina (HA) y Neuroaminidasa (NA) se presentan en su estado nativo en virosomas. Por lo tanto, también evaluamos la actividad del ODN 504 junto a la vacuna Fluarix<sup>®</sup> de GlaxoSmithkline la cual se encuentra formulada con virus inactivados (106).

En función de la actividad adyuvante propuesta del ODN 504, resultó interesante evaluar la activación de las células B de memoria. Los resultados obtenidos, en rata y en humanos, en linfocitos B de memoria, fueron satisfactorios.

Como se observa, a medida que avanzábamos en esta línea de investigación y aumentaban los resultados que caracterizaban la actividad de los ODN's *PyNTTTTGT*, más nos alejábamos del paradigma establecido en la comunidad científica, el cual afirmaba que los dinucleótidos CG no metilados dentro de un determinado contexto de bases nucleotídicas “motivos CpG”, eran los responsables de la mayor parte de las propiedades inmunoestimulantes en el sistema inmune de mamíferos. Sin embargo, a pesar del establecimiento y amplia aceptación de este paradigma en el campo de la inmunología, las actividades *in vitro* e *in vivo* que íbamos reportando por los ODN's *PyNTTTTGT*, mostraban resultados contundentes de la actividad en el sistema inmune de los vertebrados.

Continuando con el estudio de las posibles aplicaciones del ODN 504 como prototipo de los ODN's *PyNTTTTGT*, observamos que la respuesta de anticuerpos hacia las diferentes vacunas o antígenos evaluados en ratas o monos en presencia del oligonucleótido presentaban menor dispersión de los datos, es

decir, la respuesta era además de elevada más homogénea. Otra observación que nos llamó la atención, fueron los datos del protocolo experimental en monos *Cebus apella* con la vacuna AgB<sup>®</sup>. En estos animales, luego de realizar la primera inoculación, se observó que un grupo de monos respondió anormalmente con un elevado título de anticuerpos en un tiempo extremadamente corto, mientras que el resto de los animales, presentaron un bajo o moderado título de anticuerpos, como es habitual luego de 15 (quince) días de la primera inoculación. Extrañamente, en el grupo de animales que inoculamos con la vacuna AgB<sup>®</sup> mas el ODN 504, no se observaron animales hiper respondedores. Este conjunto de evidencias y observaciones, nos llevó a pensar que el ODN 504 presentaba *in vivo* una actividad inmunomoduladora.

Una patología en la cual se puede observar un tipo de desregulación del sistema inmune es la sepsis, donde se establece una respuesta inmune de signos contrarios o bifásica (107), en la cual encontramos una primera respuesta inflamatoria intensa, seguida de una respuesta anti inflamatoria compensatoria que conduce a la anergia inmunológica. En función de lo expuesto, nos propusimos evaluar al ODN 504 en procesos infecciosos que desencadenan o culminan en una sepsis o shock séptico.

La sepsis es una enfermedad con una prevalencia y mortalidad elevada, y se puede considerar como una enfermedad emergente. El aumento en la incidencia de esta patología, se debe fundamentalmente a varios factores: a pacientes de edad avanzada e inmunodeprimidos, niños o lactantes; al aumento en los procedimientos invasivos que se realizan en las unidades de terapia intensiva o de primeros auxilios; a personas con enfermedades crónicas, como diabetes, cáncer, o enfermedad renal o hepática, a personas que han tenido una quemadura grave, un trauma físico o accidente (pacientes politraumatizados) (108). Además, en la actualidad el aumento a la resistencia a antibióticos es uno de los mayores problemas en el tratamiento de la sepsis, por lo que es considerado por la Organización Mundial de la Salud un creciente problema mundial. Este organismo internacional ha elaborado una lista de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos, para tratar de guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos fármacos (109).

Desde el punto de vista fisiopatológico, la sepsis está compuesta de factores inmunológicos de signos contrarios, por un lado encontramos una respuesta pro-inflamatoria intensa, en respuesta a la infección, que contribuye al inicio y al mantenimiento de la sepsis. Sin embargo, con el objetivo de restaurar la homeostasis se produce por otro lado una respuesta compensatoria anti-inflamatoria, que sería la principal causa de la inmunosupresión (anergia) observada en la sepsis. Una vez establecida la sepsis, el

shock séptico aparece cuando el paciente presenta problemas en uno o más órganos, llamada disfunción múltiple de órganos (DMO). En esta situación, el organismo no recibe suficiente cantidad de oxígeno para funcionar apropiadamente, y es necesaria la administración de fármacos llamados “vasopresores” para aumentar la presión sanguínea. Los pacientes con shock séptico son enfermos muy graves que necesitan ingreso urgente en la unidad de cuidados intensivos (UCI) sin embargo, a pesar del tratamiento activo en la UCI, la mortalidad es elevada (110).

La investigación de nuevas terapias básicamente está orientada por un lado, a evitar una exagerada respuesta inflamatoria y, por otro lado a rescatar al sistema inmunológico del estado de anergia.

Hasta hoy no hay ningún medicamento efectivo para el tratamiento de la sepsis. En este sentido y en función de las observaciones *in vivo* mencionadas previamente, nos pareció interesante evaluar la actividad del ODN 504 en un modelo de sepsis/shock séptico generado por la inoculación de bacterias *Escherichia coli* (cepa O45K1H10) en ratas de la cepa Sprague-Dawley. Por otro lado, evaluamos la actividad del ODN 504 en células mononucleares de sangre periférica humana provenientes de individuos politraumatizados los cuales presentan baja expresión de marcadores de activación inmunológicos.

Si nos detenemos un momento y resumimos las actividades descritas hasta aquí por los oligonucleótidos *PyNTTTTGT*, podríamos confeccionar una lista en donde sin dudas, estaría en primer lugar la actividad inmunoestimulante, la cual se reflejó en una actividad adyuvante junto a antígenos o vacunas comerciales. Sin embargo, luego de los resultados obtenidos en nuestro modelo experimental de sepsis/shock séptico en ratas y en sangre periférica de individuos politraumatizados, podemos además citar una actividad inmunomoduladora del ODN 504 (prototipo de los ODN's *PyNTTTTGT*).

Indudablemente esta nueva actividad del ODN 504, sumada a las anteriores, nos vincula fuertemente al modelo de peligro/daño propuesto por Matzinger, el cual recordemos postula que moléculas propias (endógenas) del individuo son las principales señales que actúan en el desarrollo de la respuesta inmune. El ODN 504 prototipo de oligonucleótidos de la serie *PyNTTTTGT*, simularía una molécula DAMP que se libera frente a un daño en el individuo en el cual hay pérdida de la homeostasis, y en este escenario se activan diferentes moléculas, citoquinas y/o diferentes tipos celulares con el objetivo de restaurar la misma.

Los objetivos propuestos en esta tesis fueron los siguientes: 1) Determinar la secuencia de oligonucleótidos sin motivos CpG con actividad en humanos, 2) Determinar *in vitro* las células del sistema

inmune activadas por el ODN 504, 3) Evaluar su actividad adyuvante *in vivo* en diferentes especies animales y por ultimo 4) Vincular las diferentes actividades del ODN 504, *in vitro* e *in vivo*, y en función de estos resultados evaluar su rol en el Sistema Inmune de los vertebrados.

A continuación, se exponen los resultados que llevaron al descubrimiento y reporte de algunas de las actividades de los *PyNTTTTGT* que cuestionan la idea que los oligonucleótidos inmunoestimulantes en el sistema inmune de los vertebrados provienen exclusivamente de las moléculas PAMP's, o sus análogos artificiales.







# *Materiales y Métodos*

## Materiales y Métodos.

1. *Oligonucleótidos.*

Los oligonucleótidos (oligodeoxynucleótidos-ODN's) utilizados fueron proporcionados por ETC (Bethel, ME USA) resuspendidos en agua estéril apirogénica y guardados a  $-20\text{ C}$  hasta su uso.

Si las uniones inter-nucleótidos eran fosfotioato, se denominaron ODN's PS. De lo contrario, si las uniones eran fosfodiéster se denominaron ODN PO. También se utilizaron oligonucleótidos con uniones PS en los extremos 5' y 3' (señalizados con un\*) manteniendo el resto de las uniones PO, a los que se denominó ODN Mix.

En todos los casos se realizó el test de *Limulus* para determinar la contaminación por Lipopolisácarido y los niveles fueron indetectables (Kit de *Limulus* amebocyte lysate endochrome Sensibilidad: 0,015 EU/ml (Charles River Endosafe).

A continuación, se describen algunas de las secuencias de oligonucleótidos (ODN's) más representativas utilizados en este trabajo en dirección 5'-3'.

*ODN's:*

2006:	TCG	TCG	TTT	TGT	CGT	TTT	GTC	GTT
021:	TGC	TGC	TTT	TGT	GCT	TTT	GTG	CTT
022:	TGC	TGC	AAA	AGA	GCA	AAA	GAG	CAA
501:	TAG	TAG	TTT	TGT	AGT	TTT	GTA	GTT
502:	TGG	TGG	TTT	TGT	GGT	TTT	GTG	GTT
503:	TTG	TTG	TTT	TGT	TGT	TTT	GTT	GTT
504:	TCA	TCA	TTT	TGT	CAT	TTT	GTC	ATT
505:	TCC	TCC	TTT	TGT	CCT	TTT	GTC	CTT
506:	TCT	TCT	TTT	TGT	CTT	TTT	GTC	TTT

2. *Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSP).*

La sangre fue obtenida por venipuntura en humanos sanos y en monos, y por punción cardíaca en ratas, en todos los casos se utilizó heparina como anticoagulante.

Las Células Mononucleares en Sangre Periférica fueron aisladas de un gradiente de densidad por centrifugación con Ficoll-Hypaque densidad 1,077 (humanos) y 1,084 (monos, ratas cerdo, oveja) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Brevemente, las muestras de sangre fueron diluidas al medio en RPMI 1640 (Gibco cat. 11875-093) incompleto (sin suero fetal bovino) suplementado con 2 mM de L-Glutamina

(Gibco cat. 25030-081), 50 µg/mL de gentamicina (Gibco cat. 15750-060) y 20mM Hepes (Gibco cat. 15630-080), esta solución se volcó lentamente sobre un colchón de Ficoll- Hypaque, centrifugándose luego a 2000 rpm durante 20 minutos a 22°C (sin freno). Finalizado este tiempo, se aisló la interfase y se realizaron 2 lavados en RPMI Completo (RPMI incompleto más 10% Suero Fetal Bovino (SFB)- Gibco cat. 16000-044) resuspendiendo por último las células en este medio.

Finalmente se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer diluyendo las células en Solución de Azul tripán (Tripan Blue Stain 0.4% Gibco cat. 15250-061). Se trabajó siempre con un porcentaje de viabilidad mayor al 95%.

### *3. Ensayos de proliferación celular por incorporación de timidina tritiada.*

Las células mononucleares de sangre periférica proveniente de sangre de: humanos, monos, rata, cerdo y oveja fueron plaqueadas a razón de  $1 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en U (Greiner bio-one cat. 650-180). En el caso de utilizar células B puras humanas se plaquearon  $1 \times 10^4$  células/pocillo. En todos los casos, las células fueron incubadas en RPMI completo y estimuladas con los diferentes ODN PS en una concentración de 0,375µg/mL durante 72 h a 37°C en una atmósfera húmeda con 4.5% de CO<sub>2</sub>. Doce a catorce horas antes de cosechar las células se les agregó 1µCi (TH<sup>3</sup>) thymidine (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway,NJ;sp.act., 25Ci/nmol) a cada uno de los pocillos. Finalizado este tiempo las células fueron cosechadas y la incorporación de timidina tritiada fue medida en un contador de centelleo líquido (Liquid Scintillation Counter Wallac 1409 DSA).

### *4. Cultivos in vitro con oligonucleótidos para la medición de IL-6, IFN-α, IgM e IL-8.*

Para la medición de IL-6 o IgM, se plaquearon a razón de  $3 \times 10^5$  células mononucleares de sangre periférica/pocillo en placas de 96 pocillos con fondo en U en RPMI completo. En el caso que los cultivos fueran de células B o dendríticas plasmacitoides puras se utilizaron  $2-3 \times 10^5$  células/pocillo. Las células se estimularon (en todos los casos), con 6µg/mL (para IL-6) o 1.5µg/mL (para IgM) de ODN's PS. Luego de 24h o 48h de cultivo se recolectaron los sobrenadantes y se realizó un ELISA para cuantificar IL-6 e IgM respectivamente.

Para la medición de IFN-α, se plaquearon  $1 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica/pocillo en RPMI completo en el mismo tipo de placas, y se estimularon con 6 µg/mL de ODN's PS. Los

sobrenadantes se recolectaron a las 72h, y con ellos se realizó un ELISA cuantitativo para determinar las cantidades de IFN- $\alpha$ .

Para la medición de IL-8 se plaquearon  $4 \times 10^4$  células embrionarias de riñón humano 293 (Hek) por pocillo en DMEM incompleto. Se utilizaron placas de 96 pocillos con fondo plano (Greiner bio one cat. 655180). Luego del plaqueo, se estimularon las células con diferentes concentraciones de ODN's PS (0.44, 1.75 y  $7 \mu\text{g/mL}$ ). Los sobrenadantes se recolectaron luego de 24h de incubación, y se realizó un ELISA para cuantificar IL-8 humana.

En el caso de estimular con ODN's PO se agregaron tres dosis de  $30 \mu\text{g/mL}$  cada una, a las 0,4 y 18 horas de cultivo.

Las células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 4.5% de  $\text{CO}_2$  y a diferentes tiempos de cultivo, según la citoquina a determinar, se recogieron los sobrenadantes y se determinó la concentración mediante la técnica ELISA de captura.

##### 5. ELISA (*Enzyme –linked immunosorbent assay*) de captura (cuantitativo).

Para la medición de IL-6, IL-8 IgM, IFN- $\alpha$  e se realizaron ensayos de Elisa de captura estándares.

El anticuerpo de captura específico para la citoquina a determinar, (a la concentración adecuada puesta a punto previamente en el laboratorio), se diluyó en buffer  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  (0,1M pH=9) y se incubó durante toda una noche en cámara húmeda a  $4^\circ\text{C}$  ( $100 \mu\text{L}$ /pocillo) en placas de ELISA (MaxiSorp Surface NUNC catálogo 439454). En la siguiente tabla se detallan los anticuerpos de captura utilizados en los diferentes ELISAS:

Anticuerpos de captura	Marca y catálogo	Concentración final o dilución
Purified rat anti-human IL6. Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°554543	$2 \mu\text{g/mL}$
Purified Mouse Anti-human IL-8 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°554716	1/250
Purified mouse anti-human IgM Monoclonal Antibody	Serotec MCA cat n°1662	$3 \mu\text{g/mL}$
Purified Mouse Anti-human IFN- $\alpha$ . Monoclonal Antibody.	Zelltek, cat mAbCASE6	$2 \mu\text{g/mL}$

Finalizado el tiempo de pegado del anticuerpo de captura, se lavaron las placas 3 veces con PBS1x (200µL/pocillo), y se incubaron con RPMI o DMEN completo (según la procedencia del cultivo de las muestras) durante 3 h a temperatura ambiente (200µL/pocillo). Finalizado este tiempo, se lavaron las placas 5 veces con PBS-Tween 0,5% v/v (PBS-T) y se sembraron los sobrenadantes de cultivo sin diluir o diluidos en medio RPMI o DMEN completo (100µL/pocillo). En la misma placa, se sembró una curva patrón (estándar) de la citoquina a determinar a partir de una solución madre de concentración conocida. Se incubó durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda.

<b>Estándar</b>	<b>Marca y catálogo</b>
Recombinant Human IL-6.	BD Pharmingen, cat n° 550071
Recombinant Human IL-8.	BD Pharmingen, cat n°554609
Native Human IgM	Serotec MCA cat n°5275-5504.
Interferon alpha 2b	Laboratorio Pablo Cassará

Luego de 5 lavados con PBS-Tween 0,5% v/v (PBS-T) (200µL/pocillo), se incubaron las placas a temperatura ambiente 1 h con 100µL por pocillo del anticuerpo de detección específico según la citoquina a determinar, diluido en PBS-T. A continuación, se detallan los anticuerpos de detección utilizados:

<b>Anticuerpos de detección</b>	<b>Marca y catálogo</b>	<b>Concentración final o dilución</b>
Biotinylated rat anti-human IL6 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°554546	1µg/mL
Biotinylated rat anti-human IL8 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°554718	1/1000
F(ab) <sub>2</sub> Goat anti human IgM HRPO.	Serotec Start 99P	1/2000
Rabbit Anti-human IFN-α	Zelltek, (Santa Fe, Argentina)	1/1000

Finalizado el tiempo de incubación con el anticuerpo de detección, en el caso de la determinación de IgM, se continuó con el revelado de las placas. Para ello, las placas se lavaron 5 veces con PBS-T y luego se revelaron con una solución de orto-fenildiamina 1mg/mL (OPD Sigma P9029) en buffer Citrato-fosfato (ácido cítrico 0,025M, fosfato dibásico de sodio 0,05M; ph=5), y agua oxigenada 0,1% v/v (100µl/pocillo). Las placas se resguardaron de la luz durante 8-12 minutos (según la citoquina a determinar) y luego se detuvo la reacción con el agregado de H<sub>2</sub>SN<sub>4</sub> 2N (50µL/pocillo) y se leyeron a 490 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad).

En el caso de determinar las citoquinas IL-6 y IL-8, luego de los lavados se continuó con el agregado de Estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SAv-HRP, BD Pharmingen cat 554066), diluida 1/2000 en PBS-T (50µl/pocillo), durante una hora a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, las placas se lavaron y revelaron como se describió previamente.

En el caso de la determinación de IFN- $\alpha$ , las placas se incubaron durante 2 (dos) horas a temperatura ambiente con el anticuerpo de cabra Anti-Rabbit IgG ( $\gamma$ -chain specific) conjugado a peroxidasa (DAKO PO0048) diluido 1/1000 en PBS-T (100µL/pocillo). Luego se lavaron las placas y se revelaron como se describió previamente.

#### *6. Purificación de células dendríticas plasmacitoides (CDP) y linfocitos B (LB).*

Las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas fueron obtenidas por Ficoll-Hypaque a partir de buffy coat provenientes del Hospital Alemán, Servicio de Hemoterapia e Inmunohematología. En todos los casos se utilizó buffy coat a los cuales el screening serológico (estudios sero-inmunológicos) fue negativo.

Los linfocitos B se obtuvieron utilizando MACS por selección negativa (cat. 130-091-151 Miltenyi Biotech, Bergish Gladbach Germany). Brevemente, las CMSP se pasaron por un filtro de pre-separación (cat. 130-041-047 Miltenyi) para eliminar agregados, luego se resuspendieron en MACS buffer (PBS1x-BSA 0.5% EDTA 2mM ph=7.2) en una concentración  $1 \times 10^7$  cell/40µL y se agregó el “cocktail de anticuerpos biotinilados”, el cual contiene anticuerpos monoclonales conjugados a biotina anti-: CD2, CD14, CD16, CD36, CD43 y CD235a (Glycophorin A) (10µL/10<sup>7</sup> células). La suspensión celular se homogeneizó suavemente y se incubó por 5 minutos a 4°C. Finalizado este tiempo, se agregaron 30µL de MACS buffer cada 10<sup>7</sup> células, seguido de 20µL de microesferas magnéticas (microbeads) anti-biotina cada 1x10<sup>7</sup> células. Esta suspensión se incubó durante 10 minutos a 4°C. Por último, se pasaron las células

a través de una columna de separación magnética LS (cat. 130-042-401 Milteny) que se encontraba adosada a un campo magnético. La columna se lavó con MACS buffer (3 x 3 mL) y el eluido de la misma representó la fracción enriquecida de células B.

Para obtener el resto de células depletadas de células B, se separó la columna del campo magnético, se agregó 3-5-mL de MACS buffer y se hizo presión con un émbolo estéril, de esta manera se obtuvo la fracción retenida en la columna.

Las células dendríticas plasmacitoides (CDP) fueron aisladas utilizando MACS por selección positiva (catálogo BDCA-4/130-090-532). Por esta metodología, también se obtuvieron linfocitos B (catálogo CD19/130-050-0301). Para ello, las CMSP se pasaron por un filtro de pre-separación, luego se contaron y se resuspendieron en MACS buffer en una concentración  $1 \times 10^7$  cell/80 $\mu$ L. Luego se agregó 20 $\mu$ L/ $1 \times 10^7$  células, de microesferas magnéticas (microbeads) cubiertas con anti-BCDA-4, en el caso de separar las CDP o con un anti-CD19 para obtener las células B puras. La suspensión celular se incubó durante 15 minutos a 4° C. Finalizado este tiempo se realizó un lavado con 15 mL de MACS buffer, se centrifugaron las células y se resuspendieron en 0,5mL del mismo buffer. Esta suspensión se pasó a través de una columna de separación magnética LS que se encontraba adosada a un campo magnético, de esta manera las células que no se encuentran unidas al anticuerpo (BDCA-4 o CD19) eluyen mediante sucesivos lavados con MACS buffer (3 x 3 mL c/u). Por lo tanto, el eluido de esta columna representa la fracción depletada de células PDC o B. Finalizados los lavados se retiró la columna del campo magnético y se colocó un tubo estéril en la salida de ésta. Luego se agregó 3 mL de MACS buffer en la columna y con un émbolo estéril se hizo presión para que eluya la fracción retenida. Las células PDC o B puras obtenidas se resuspendieron en RPMI completo y la pureza fue testeada por citometría de flujo utilizando anticuerpos CD4PE-CD11cAPC-MHCIIFITC para CDP o CD19PE para las células B.

En todos los casos la pureza obtenida fue mayor al 96%.

#### *7. Tinción para FACS (Citometría de Flujo) en microplaca.*

Las células provenientes de CMSP o las diferentes poblaciones celulares humanas previamente purificadas, fueron incubadas con RPMI completo en placas de 96 pocillos con fondo en U y estimuladas con los diferentes ODN's PS o Mix a 1,5  $\mu$ g/mL. En aquellos experimentos en los que se utilizó ODN's PO, con el objetivo de contrarrestar la degradación de las nucleasas, se agregaron tres dosis de 30 $\mu$ g/mL



cada una, a las 0,4 y 18 horas de cultivo. Las células se incubaron durante 24, 48 o 72 h según la activación celular que se deseaba medir.

Brevemente, se tomó la placa de cultivo y se aspiró con una pipeta el máximo volumen de sobrenadante de cada uno de los pocillos, cuidando de no extraer las células. Se agregó el anticuerpo según lo recomendado por la ficha técnica de cada anticuerpo y se homogenizaron las células con el anticuerpo golpeando suavemente la placa en los costados. En el caso de marcaciones dobles, se realizó una tinción por separado para cada uno de los anticuerpos, con el fin de ser utilizadas en la compensación de las lecturas. Se tapó la placa de cultivo y se dejó durante 30 minutos en hielo y oscuridad. Finalizado este tiempo, se lavaron las células con 180  $\mu$ L de medio RPMI 1640 completo frío y se centrifugó la placa durante 5 minutos a 1000-1200 rpm, se aspiró el sobrenadante como se describió anteriormente y se repitió esta operación una vez más. Se agregó 200 $\mu$ L de PBS formol al 1% (frío), se homogenizaron las células y la placa se guardó a 4°C hasta la lectura en el citómetro de flujo.

En el momento de leer en el FACS se centrifugó la placa 1000-1200 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante como se describió anteriormente y se agregó 200 $\mu$ L de PBS1X frío. Se homogenizaron las células y se las pasó a un tubo de poliestireno (BD cat.352052) al que se agregó 180  $\mu$ L de PBS frío. Los tubos se mantuvieron en frío y en oscuridad durante todo el tiempo hasta la lectura y se leyeron en el Citómetro de Flujo (FACScan, BD Biosciences Immunocytometry Systems). Los datos se analizaron con el programa de computación Win MDI 2.8.

Los diferentes anticuerpos utilizados para humanos fueron adquiridos a Milteny o Serotec: CD19-PE (130-098-068/clon LT19 Milteny), CD86-FITC(130-098-182/clon F1195 Milteny ), CD4-PE (130-098-134/clon MT4669 Milteny ),CD40-FITC (MCA1590F/clon LOB 7/6 Serotec), MHCI-FITC (130-101-447/clon REA230 Milteny), MHCII-FITC(MCA 477F/clon WR18 Serotec), CD11C-APC(130-092-412/clon MJ427612 Milteny), CD69FITC (MCA 1442 Serotec), CD59RPE (MCA 1437PE Serotec), CD14-PE (130-110-577/clon: REA599 Milteny).

- La tinción para FACS (Citometría de Flujo) en ratas, se realizó sobre esplenocitos (3 x 10<sup>5</sup>células/pocillo) de animales inoculados previamente con una dosis diaria durante 5 (cinco) días con el ODN 504 PS (4mg/Kg o 20mg/Kg) o Solución Fisiológica (control). Dos días luego de la última dosis se sacrificaron los animales, se procesaron los bazos y se tiñeron las células como se describió previamente. Se utilizaron los siguientes anticuerpos de B&D Pharmingen: CD 45R-PE mouse anti-rat (cat.554881

clone His 24) y CD 40-FITC hámster anti mouse/rat (cat. 553723). En el caso de evaluar la expresión CD40<sup>+</sup> en linfocitos B (CD45R<sup>+</sup>) de CMSP se realizó la reacción con  $1 \times 10^6$  de células/pocillo.

## 8. Animales.

Durante el desarrollo de este trabajo de tesis se han utilizado **ratas** de la especie *Rattus norvegicus* cepa Sprague-Dawley y Wistar, hembras o machos entre 6-8 semanas (adultos jóvenes) o 20-22 meses (ancianas) de edad. También se utilizaron **ratones** de la especie *Mus musculus*, hembras adultas jóvenes de la cepa Balb/c o CF-1, de 6-8 semanas de edad, con un peso aproximado de 18-22 grs. Las ratas y ratones se obtuvieron del Laboratorio Bio-Fucal, donde son controlados bacteriológica y parasitológicamente a fin de certificar su buen estado de salud. Durante el transcurso del protocolo, los animales fueron mantenidos en las instalaciones del Bioterio de Inmunoquímica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA (donde recibieron las mismas condiciones de alojamiento que fueron otorgadas desde el destete hasta la fecha de finalización del protocolo). La temperatura del sector se mantuvo en  $21 \pm 3^\circ\text{C}$ . El régimen de iluminación fue de 12 h luz -12 h oscuridad. Todos los animales tuvieron acceso libre al agua y alimento.

Los **monos** utilizados en las inmunizaciones fueron adultos (machos y hembras) de la especie *Cebus apella*. Los experimentos en estos animales fueron realizados en el CEMIC (Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas) Buenos Aires, Argentina bajo la supervisión del Dr. Carlos Nagle.

La sangre de los monos de las especies *Macacca fascicularis* y *Papio hamadryas* fue obtenida de animales del Zoológico de Buenos Aires (CABA) bajo la supervisión de la médica veterinaria Dra. Carolina Marull.

El cuidado y uso en estos animales se realizó bajo lineamientos internacionales (Guide to the Care and Use of Experimental Animals. Canadian Council on Animal Care (CCAC, 1998).

## 9. Vacunas.

Las diferentes vacunas o soluciones antigénicas fueron preparadas en condiciones de esterilidad y de ser necesario, cada preparación fue diluida con Solución Fisiológica calidad inyectable (Roux Ocefa S.A.)

- A. Antígeno de superficie del virus de Hepatitis B (HBsAg) (Laboratorio Pablo Cassará SRL, Buenos Aires).

- B. Vacuna Hepatitis B Recombinante, AgB<sup>®</sup> (Laboratorio Pablo Cassará SRL, Buenos Aires/Antígeno Proteico de Superficie de Hepatitis B Recombinante HBsAg). Dosis pediátrica (10mcg/0.25mg aluminio (como hidróxido de aluminio). Dosis adulta (20mcg/0.5mg aluminio (como hidróxido de aluminio).
- C. Vacuna Hepatitis A inactivada, Havrix 360<sup>®</sup> Laboratorio SmithKline Beecham. La dosis pediátrica (no menor a 360 unidades ELISA, UEL) es una suspensión estéril que contiene el virus de la hepatitis A (cepa HM 175) inactivado en formaldehído y adsorbido en hidróxido de aluminio. La dosis adulta contiene 720 unidades de ELISA y también se encuentra absorbida a hidróxido de aluminio.
- D. Vacuna Virosomal del virus de Hepatitis A Virohep-A<sup>®</sup> Berna. Una dosis (0,5 ml) contiene como mínimo 24 U.I. de antígeno del virus de Hepatitis A (cepa RG-SB). Excipientes: Adyuvante Hemaglutinina del Virus de influenza como mínimo 5µg/0.5mL, Fosfolípidos como máximo 350µg.
- E. Vacuna antirrábica humana VeroRab<sup>®</sup> Sanofi Pasteur. Una dosis de 0.5mL contiene virus rábico inactivado (cepa PM/WI-38-1503) correspondiente a un poder protector superior o igual a 2,5 UI cultivado en la línea celular Vero (línea celular a partir de células epiteliales del riñón de un mono africano *Chlorocebus sp.*). Además, contiene maltosa y albúmina humana plasmática como excipientes. La ampolla o jeringa contiene 0.5 mL de una solución de cloruro de sodio al 4% como diluyente, y una vez realizada la mezcla se debe administrar rápidamente.
- F. Vacuna Virosomal Inflexal<sup>®</sup> V Berna. Formulada con antígenos de superficie del virus de la gripe (Hemaglutinina/HA y Neuroaminidasa/NA) de las siguientes cepas: A/Fujian/411/2002 (H3N2) 15 µg (HA); A/New Caledonia/20/99 (H1N1) 15 µg (HA) y B/Hong Kong/330/2001 15 µg (HA), por dosis de 0.5 ml. Inflexal V es una vacuna antigripal inactivada, formulada con virosomas como sistema transportador/adyuvante.
- G. Vacuna Fluarix<sup>®</sup> GlaxoSmithKline. Vacuna trivalente de virus inactivado conteniendo las siguientes cepas: A/New Caledonia/20/99 (H1N1); A/California/7/2004 y B/Malasia/2506/2004]. Cada dosis de 0,5 ml de vacuna contiene 15 µg de hemaglutinina de cada una de las cepas recomendadas.
- H. Hidróxido de aluminio (OH)<sub>3</sub>Al “Alhydrogel” al 2% (ALOOH o alúmina) de Laboratorio Pablo Cassará.

### 10. Inmunizaciones, cultivos y recolección de muestras en ratón.

Para llevar a cabo las inmunizaciones con el antígeno recombinante de Hepatitis B (HBsAg) se formaron grupos de 6 (seis) animales cada uno y se inmunizaron por vía intramuscular en el cuádriceps de la pata trasera derecha utilizando una jeringa para insulina (BD Ultra-Fine II 8mm/0.3mm) en un volumen final de 50µL. Las diferentes soluciones antigénicas se prepararon con los siguientes reactivos: 3µg de HBsAg, AIOOH 20% v/v y ODN's 20µg/animal. Se conformaron 5 (cinco) grupos experimentales: *grupo 1*: HBsAg, *grupo 2*: HBsAg + ALOHH, *grupo 3*: HBsAg + ALOHH + ODN 1826 PS, *grupo 4*: HBsAg + ALOHH + ODN 504, *grupo 5*: HBsAg + ALOHH + ODN 1826 CG inv. PS.

Secuencia de ODN's utilizados exclusivamente en ratón en dirección 5' → 3'

ODN 1826: TCCATGACGTTCCCTGACGTT

ODN 1826 CG invertido (CG inv.): TCCATGAGCTTCCTGAGCTT

El subrayado indica la presencia de dinucleótidos CpG.

A los 30 días post-inmunización se obtuvo el suero de cada uno de los animales inmunizados. Para ello, se realizó una pequeña punción en el seno submaxilar (sangría exploratoria) y luego se sacrificaron con una concentración de Ketamina (141mg/Kg) y Xilacina (20 mg/Kg). La muestra de sangre obtenida para el dosaje de anticuerpos anti-HBsAg fue de un volumen mínimo aproximado de 0.2-0.3 ml y se colectó en microtubos tipo Eppendorf de 1.5 ml.

Una vez obtenida, la sangre fue incubada durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se centrifugó a 2000-2500 r.p.m. durante 7-10 minutos para separar el suero. Los sueros obtenidos fueron centrifugados nuevamente a 2000-2500 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar restos de glóbulos rojos. Luego fueron alicuotados y conservados a -20°C hasta su uso.

La obtención de esplenocitos de animales naive se obtuvo removiendo el bazo asépticamente y disgregando el órgano con la parte posterior de un émbolo estéril en medio RPMI 10% SFB (RPMI completo) bajo condiciones de esterilidad. La suspensión de células obtenidas se trató por 4 minutos a temperatura ambiente con una solución Tris HCl 0.017M-Cloruro de amonio 0.144M pH=7.2 con el objetivo de lisar los glóbulos rojos. Luego se lavaron las células con 3mL de medio RPMI completo dos veces y se resuspendieron los esplenocitos en 1 mL de medio completo, luego se contaron las células en una cámara de Neubauer.

Para el análisis por citometría de flujo (FACS) se sembró en una placa de cultivo de 96 pocillos con fondo en U (Greiner Bio-One)  $1 \times 10^6$  células por pocillo en un volumen final de  $100 \mu\text{L}$  en presencia de  $1,5 \mu\text{g/mL}$  de los ODN's 1826/504/1826 CG invertido o medio de cultivo (RPMI completo) durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$ -4,5%  $\text{CO}_2$ . Finalizado este tiempo se tiñeron las células como se describió previamente con los siguientes anticuerpos de Serotec CD19PE (MCA1439/clone6D5) y CD69FITC (MCA1580F/clone H1.2F3).

Para el ensayo de proliferación por incorporación de timidina tritiada y determinación de IL-6, se sembraron  $3 \times 10^5$  esplenocitos/pocillo en presencia de los diferentes ODN's en una concentración  $6 \mu\text{g/mL}$  o medio de cultivo.

La determinación de IL-6 se realizó en los sobrenadantes luego de 24 h de cultivo a  $37^\circ\text{C}$  en una atmósfera húmeda con 4.5%  $\text{CO}_2$  mediante la técnica ELISA de captura como se describió previamente. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: Purified Rat anti mouse IL-6/ $2 \mu\text{g/mL}$  (catálogo 554400 BD Pharmingen), Biotin Rat anti mouse IL-6/ $0.5 \mu\text{g/mL}$  (catálogo 554402 BD Pharmingen) y Recombinant IL-6 mouse (catálogo 554582 BD Pharmingen).

#### 11. *Imunizaciones y recolección de muestras en monos.*

Monos de la especie *Cebus apella* fueron inmunizados por vía intramuscular en el músculo deltoide derecho o izquierdo con una dosis de la vacuna AgB<sup>®</sup> (dosis pediátrica) en ausencia o en presencia de  $150 \mu\text{g}$  de ODN's (semana 0). Cuatro semanas luego de la primera dosis recibieron una segunda dosis (booster o refuerzo) de igual formulación a la primera dosis (semana 4).

La evaluación de la respuesta inmune a la vacuna de Hepatitis A, se realizó inoculando monos *Cebus apella* por vía intramuscular, con dos dosis de la Vacuna Havrix<sup>®</sup> (dosis pediátrica) en ausencia o en presencia de  $300 \mu\text{g}$  del ODN504. El tiempo transcurrido entre la primera y segunda dosis fue de 4 semanas (semana 0 y 4 respectivamente).

En todos los casos se obtuvieron muestras de sangre de cada animal inmunizado antes de la primera dosis (extracción basal) y en las semanas 2, 4, 6, 8 y 12, a partir de los cuales se separó el suero y se guardó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

La respuesta de anticuerpos generada en el suero de los animales inmunizados con la vacuna AgB<sup>®</sup> fue determinada mediante un Kit comercial de Elisa (AUSAB anti-HBs IgG EIA, Abbott Laboratorios,

Abbott Laboratories, Diagnostics Division, IL, USA). Se consideró 10 mUI/mL como límite de seroconversión al igual que en humanos.

Para la evaluación de la respuesta de los animales inmunizados con la vacuna Havrix<sup>®</sup>, se utilizó un Kit comercial de Elisa (HAVAB<sup>®</sup> anti HAV IgG EIA, Abbott Laboratories, Diagnostics Division, IL, USA). Ambos ELISAS (Hepatitis B y A) son cuantitativos.

## *12. Inmunizaciones y recolección de muestras en ratas.*

Para las inmunizaciones se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley. Se formaron grupos de 6 a 10 animales cada uno.

Los animales fueron inmunizados en forma intramuscular en el cuádriceps de la pata trasera izquierda y se utilizó una jeringa para tuberculina (Neojet 15 x 5).

Las dosis de las vacunas variaron según el antígeno utilizado.

- Para el antígeno de Hepatitis B (HBsAg) se realizaron dos protocolos experimentales en los cuales no se utilizó alúmina. En uno se emplearon diferentes dosis de antígeno (1, 3 y 9µg) en ausencia o en presencia de 50µg/dosis del ODN 504 PS y en el otro protocolo experimental se empleó una masa constante del antígeno HBsAg (3µg) con el agregado o no de tres dosis diferentes (10, 50 y 250µg) del ODN504 PS. Por último, se utilizaron tres dosis del antígeno HBsAg (1, 3 y 9µg) en presencia de 500µg de alúmina con y sin el agregado de 50µg/dosis del oligonucleótido 504 PS. En todos los casos se aplicó una única dosis.

Además, el antígeno HBsAg se evaluó junto al ODN 1018 ISS (5'TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA 3'). Para ello, se utilizaron 3µg HBsAg más 50µg del ODN 1018 ISS (PS) u ODN 504 PS por animal/dosis. Cada animal recibió dos dosis con un intervalo de 30 días.

- Vacuna AgB<sup>®</sup> dosis adulta: se inmunizó una única dosis con dosis variable del antígeno HBsAg (0.1 a 3µg) en ausencia o en presencia de 50µg del ODN504 PS/animal/dosis. En las dosis 0.1; 0.3 y 1µg de HBsAg se agregó alúmina extra para mantener constante la masa de la misma en cada preparación (75µg alúmina).

- Vacuna de Hepatitis A Havrix<sup>®</sup> 720 UEL: se inmunizó una única dosis conteniendo 3 (tres) diferentes cantidades de UEL (10, 40 y 160 UEL) en ausencia o en presencia de 50µg de ODN 504 PS/animal/dosis.

- Vacuna de Hepatitis A Virohep-A<sup>®</sup>: se inmunizó con una única dosis conteniendo diferentes cantidades de U.I (4.8, 0.48, 0.048, 0.016 y 0.054 U.I) en ausencia o en presencia de 50µg de ODN 504 PS por animal/dosis.
- Vacuna VeroRab<sup>®</sup>: se inmunizó con una única dosis conteniendo diferentes diluciones de la vacuna (1/5, 1/25, 1/125/, 1/625 y 1/3.125) en ausencia o en presencia de 50µg de ODN 504PS por animal/dosis.
- Vacuna Inflexal<sup>®</sup> V: se inmunizó con una única dosis conteniendo diferentes cantidades de Hemaglutinina (0.002, 0.11, 0.05, 0.16, 0.5, 1.6 y 12.5µg/HA) en ausencia o en presencia de 50µg de ODN 504 PS por animal/dosis.
- Vacuna Fluarix<sup>®</sup>: se inmunizó con una única dosis conteniendo 1µg de Hemaglutinina (HA) en ausencia o en presencia de 50µg de ODN 504 PS por animal/dosis.

Las múltiples inmunizaciones correspondientes a los esquemas de “Prime booster” (capítulo C) se realizaron de la siguiente manera:

- Prime booster heterólogo: Se inmunizaron al día 0 (primado) tres grupos de animales con diferentes soluciones antigénicas: **grupo 1**: 3µg HBsAg, **grupo 2**: 3µg HBsAg + 75µg de ALOOH y **grupo 3**: 3µg HBsAg + 75µg de ALOOH + 50µg de ODN504. A los 30 días post inmunización los tres grupos de animales recibieron una única dosis (booster) de 3µg HBsAg + 50µg de ODN504.
- Prime booster homólogo: El **grupo 4** recibió durante el primado (día 0) y en el booster (30 días) la misma solución de antígeno: 3µg HBsAg + 50µg de ODN504.
- Prime booster homólogo convencional: El **grupo 5** recibió durante el primado (día 0) y en el booster (30 días) la misma solución de antígeno: 3µg HBsAg + 75µg de ALOOH
- Prime booster homólogo de doble adyuvancia: El **grupo 6** recibió durante el primado (día 0) y en el booster (30 días) la misma solución de antígeno: 3µg HBsAg + 75µg de ALOOH + 50µg de ODN504.

En todos los casos se obtuvo una muestra de suero de cada animal a los 30 días post primado (previo al booster) y post booster (60 días de la primera dosis o primado). De cada muestra se determinó el título de IgG total específica anti HBsAg mediante la técnica ELISA (ver ítem 13).

En los diferentes protocolos experimentales se obtuvieron muestras de sangre a diferentes días post-inmunización (d.p.i) por sangría exploratoria, a partir de los cuales se separó el suero y se guardó a -20°C

hasta su uso. Para ello, los animales se anestesiaron previamente con una dosis de Ketamina/Xilacina (35/7 mg/Kg), y una vez que se encontraron en plano quirúrgico se sumergió la cola en un vaso de precipitado de plástico conteniendo agua tibia (35-37 C°) durante 2-3 minutos, al mismo tiempo que se realizaban pequeñas fricciones a modo de masajes con el fin de vasodilatar la vena coccígea. Luego se realizó una pequeña incisión con un bisturí en el extremo de la cola con el objetivo de obtener un pequeño volumen de sangre de la misma. Una vez obtenida la sangre, se separó el suero como se describió previamente.

El día del sacrificio los animales se anestesiaron como se describió previamente, y luego se realizó punción cardiaca con el objetivo de obtener un volumen mayor de sangre (aproximadamente 6 a 9 mL). Para ello, se utilizó una jeringa de 10 mL con una aguja 21G x 25mm (25 x 8/21G x 1”), este mismo procedimiento de extracción de sangre se empleó cuando se aislaron células mononucleares de sangre periférica por Ficoll-Hypaque.

*13. Determinación de anticuerpos por el método de Elisa Directo o Indirecto (ELISA semi-cuantitativo).*

Para evaluar los niveles de IgG total específica en el suero de ratas Sprague-Dawley o en humanos, se realizaron técnicas ELISA (directos e indirectos).

Para evaluar los niveles de anticuerpos específicos anti-Hepatitis B, se utilizó para absorber a la placa de ELISA (Nunc MaxiSorp cat.439454), una solución de 4µg/mL HBsAg en buffer Carbonato-Bicarbonato (0,05M, pH=9,6).

Con el fin de evaluar los niveles de anticuerpos hacia la vacuna Inflexal<sup>®</sup>V se utilizó para absorber a la placa una solución de 2µg/mL de la Vacuna Inflexal<sup>®</sup>V en buffer Carbonato-Bicarbonato (0,05M, pH=9,6).

A los fines de evaluar los niveles de anticuerpos hacia la vacuna Fluarix<sup>®</sup> se utilizó para absorber a la placa una solución de 2µg/mL de la Vacuna Fluarix<sup>®</sup> en PBS 1x (pH=7,2).

Para evaluar los anticuerpos anti la vacuna Virohep A Berna<sup>®</sup> se utilizó para absorber a la placa una dilución 1/10 de la vacuna Virohep A Berna<sup>®</sup> en buffer Carbonato-Bicarbonato (0,05M, pH=9,6).

En el caso de los ELISAS para evaluar los niveles de anticuerpos generados hacia la Vacuna VeroRab<sup>®</sup>, se preparó una solución para absorber a la placa de 40µg/mL en PBS 1x (pH=7.2), a partir del sobrenadante de cultivo concentrado e inactivado del virus de la rabia crecido en células Vero.



Las placas se incubaron toda la noche (overnight, o.n.) a 4°C (100µL/pocillo), y luego se bloquearon con leche en polvo descremada al 8% en el buffer de pegado durante 2 h a 37°C (200µL/pocillo). Finalizado este tiempo se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween se sembraron diluciones seriadas al medio de las muestras en PBS-Tween y se incubaron durante 1.5 h a 37°C. En el caso de sembrar una única dilución, las muestras se sembraron por duplicado.

Luego de lavar 5 veces con PBS-Tween (200µL/pocillo), en el caso de determinar los niveles de IgG Total en ratas Sprague-Dawley, se añadió 100µL/pocillo del anticuerpo de conejo anti  $\gamma$  de rata conjugado a peroxidasa de rabanito (Sigma A5795) diluido 1/5000 en PBS-T, y se incubó durante 1h a 37°C.

Para la determinación de las subclases de IgG en ratas, se utilizó anticuerpos de ratón anti rata  $\gamma$ 1,  $\gamma$ 2b, (Serotec catálogos MCA 194 y MCA 1294 respectivamente) diluidos 1/1000 en PBS-T (100µL/pocillo). Luego de incubar 1 h a 37°C se lavó la placa como se describió anteriormente y se agregó el anticuerpo de cabra anti ratón conjugado a peroxidasa de rabanito (Sigma A catálogo 3673) diluido 1/5000 en PBS-T (100µL/pocillo) y se incubó 1h a 37°C.

En el caso de evaluar IgG humana (ELISA IgG Total anti Verorab<sup>®</sup>, Capítulo E), se utilizó el anticuerpo de cabra anti IgG humana conjugado a peroxidasa de rabanito (Zymed catálogo 628320) diluido 1/2000 en PBS-T (100µL/pocillo).

Para evaluar los niveles de anticuerpos IgG anti HBsAg en ratón, se utilizó el anticuerpo de cabra anti- $\gamma$  de ratón (Sigma catálogo 1397) diluido 1/2000 en PBS-T (100µL/pocillo). Luego de incubar 1h a 37°C se agregó el anticuerpo de conejo anti cabra conjugado a peroxidasa de rabanito (Sigma catálogo 5420) diluido 1/5000 en PBS-T, y se incubó durante 1h a 37°C (100µL/pocillo).

Finalizado el tiempo de incubación de los anticuerpos conjugados, se procedió al revelado con una solución de ortofenildiamina (OPD) como se describió previamente.

El título de anticuerpos se determinó como la inversa de la última dilución que se consideró positiva, definiendo como punto de corte una O.D. de 0.15 (a 490nm), el cual fue dos veces mayor a un pool de Suero Normal de Rata (20 animales sin inmunizar).

En ratas Sprague-Dawley inmunizadas con la vacuna Virohep-A Berna<sup>®</sup> se utilizó el Kit ARCHITEST HAVAb-IgG, el cual es un método de detección cualitativo del anticuerpo IgG específico al virus de la Hepatitis A (IgG anti VHA). Por esta metodología, los anticuerpos presentes en las muestras reconocen específicamente a la glicoproteína del virus de Hepatitis A y se calculan los valores de S/CO (signal-to cut-off: relación entre la señal que produce la muestra y el valor de corte para el método). Los resultados se expresan como: sueros reactivos, aquellos sueros que reconocen a la glicoproteína viral

respecto al punto de corte  $S/CO \geq 1.1$ , y sueros no reactivos como aquellos sueros que no reconocen a la glicoproteína viral con un valor  $< 1.1$ .

*14. Cultivo y determinación de IFN- $\gamma$  en esplenocitos provenientes de ratas inmunizadas.*

Los animales fueron inmunizados con el antígeno de HBsAg como se describió previamente. Luego de 30 días post-inmunización, los animales fueron anestesiados y se le extrajo la sangre por punción cardíaca como se describió previamente, luego se removió el bazo asépticamente y se preparó bajo condiciones de esterilidad, un homogenato celular (esplenocitos). Para ello, se disgregó el órgano con la parte posterior de un émbolo estéril en medio RPMI completo. La suspensión de células obtenidas se trató por 4 minutos a temperatura ambiente con cloruro de amonio para lisar los glóbulos rojos. Luego de 2 (dos) lavados, se resuspendieron los esplenocitos en 1 mL de medio RPMI completo y se procedió a contar las células en cámara de Neubauer. Se sembraron en una placa de cultivo de 48 pocillos (Greiner Bio-One),  $5 \times 10^6$  células por pocillo en un volumen final de 500  $\mu$ L en presencia o ausencia del antígeno HBsAg en una concentración final de 0,5  $\mu$ g/mL. A las 48 h se recogieron los sobrenadantes y se midió la concentración de IFN- $\gamma$  por la técnica ELISA de captura, en similares condiciones a las descriptas anteriormente. Los reactivos utilizados para este ensayo fueron: Anticuerpo de captura: ratón anti IFN- $\gamma$  de rata (MCA 1301XZ, Serotec), Anticuerpo biotinilado (detección): cabra anti IFN- $\gamma$  de rata (AAR34B Serotec), Streptoavidina conjugada con peroxidasa: (554066, Pharmingen, San Diego, CA) y Proteína recombinante IFN- $\gamma$  de rata (PRP27A, Serotec).

*15. Determinación de la Protección en ratas inmunizadas con el virus de la Rabia (Desafío).*

Los animales fueron inmunizados con diferentes diluciones de la Vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia o en presencia del ODN 504PS. A los 19 días post inmunización (dpi) se obtuvo una muestra de sangre para determinar los niveles de anticuerpos IgG específica. Luego de obtener las muestras de sangre, los animales fueron transportados a las instalaciones de San Jorge Bagó para llevar a cabo el desafío con el virus vivo (descarga). Este procedimiento se realizó en las instalaciones del Laboratorio San Jorge Bagó, las cuales poseen laboratorios de seguridad biológica aptos para trabajar con el virus rábico. El procedimiento experimental estuvo a cargo de la Dra. Veterinaria Verónica Sierra, directora del laboratorio Control de Procesos del Departamento de Microbiología del Laboratorio San Jorge Bagó.

A los 21 dpi se llevó a cabo el desafío o descarga del virus vivo en los animales inmunizados. Para ello, los animales fueron anestesiados con Ketamina/Xilacina (35/7mg/Kg) y se les practicó una perforación en el cráneo con un torno (de dentista). Luego se les inoculó por vía intracerebral 0,03 mL de buffer de dilución del virus (buffer NIH al 2% en suero normal equino) conteniendo 100 DL50.

Luego de la inoculación del virus rábico los primeros signos de la enfermedad usualmente aparecen a los 4-6 días, antes de este tiempo cualquier manifestación clínica observable o muerte del animal se debe al procedimiento realizado.

Los signos clínicos característicos de la infección por el virus rábico están relacionados con diferentes alteraciones del sistema nervioso central como por ejemplo: temblores, movimientos circulares, convulsiones, parálisis etc. que culminan con la muerte del animal.

Durante los 21 días sucesivos cada animal fue observado dos veces al día, a la mañana (8-9 a.m.) y a la tarde (3-4 p.m) y se registraron cambios en el comportamiento, reacción al tratamiento y mortalidad en estos animales.

En cada ensayo de protección se tituló la descarga con el objetivo de verificar si las DL50 que se utilizaron en cada ensayo de protección (100DL50) fueron las correctas luego de llevar a cabo el procedimiento experimental (diluciones) a partir de la semilla o stock viral. Para ello, se conformaron 3 (tres) grupos de 6 (seis) animales cada uno, los cuales se inocularon de la siguiente manera: el grupo 1 (uno) recibió la descarga (100 DL50), el grupo 2 (dos) recibió la dilución  $10^{-2}$  de la descarga (1 DL50) y el grupo 3 (tres) recibió medio NIH, el cual se utilizó para realizar las diluciones del virus.

#### *16. Inmunización en humanos.*

Se conformaron 2 (dos) grupos de individuos del sexo masculino con edades comprendidas entre 39 y 51 años de edad con un rango de peso promedio de 70.2 a 84.5 Kg. Todos los individuos fueron voluntarios sanos los cuales firmaron un consentimiento de acuerdo a las Normas Éticas Internacionales de Investigaciones Biomédicas, las cuales involucran humanos voluntarios.

Los individuos recibieron una dilución al 1/5 (quinto) de la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia (Grupo Control), o en presencia, de 1mg del ODN 504 (Grupo ODN 504). Las diferentes formulaciones (en ausencia o en presencia del ODN 504), se ajustaron a un volumen final de 0.5mL con Solución Fisiológica de cloruro de sodio calidad inyectable (Roux Ocefa S.A).

El esquema de inmunización empleado consistió en 3 (tres) inoculaciones por vía intramuscular en el brazo derecho a los 0, 30 y 60 días. Previo a la primera dosis y luego de cada inmunización se obtuvieron muestras de suero a los 15 y 30 días, a los cuales se les determinó los niveles de IgG Total específica mediante la técnica ELISA desarrollado en nuestro laboratorio, como se describió previamente. Además, se determinó el título de anticuerpos específicos IgG anti-la glicoproteína D del virus de la rabia (UI/mL) mediante el kit de Platelia™ Rabies II Human (The Platelia Rabies II kit cat. 3563694).

*17. Método colorimétrico para determinar la diversidad de anticuerpos producidos contra un antígeno (Evaluación de la diversidad antigénica por acción del ODN 504)*

Las secuencias peptídicas de la Hemaglutinina (HA) proveniente de las diferentes cepas del virus de Influenza fueron obtenidas del Departamento de Química Biológica del GBF (German Research Center for Biotechnology, Alemania) las cuales fueron sintetizadas y ensambladas en una membrana de celulosa, de acuerdo a lo descrito en *Methods in Molecular Biology*, vol 66: Epitope Mapping Protocols, Capítulo 15: SPOT Síntesis.

Los sueros testeados fueron los siguientes: 1. Suero ODN 504: proveniente de 3 pools diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 0.16µg HA más 50µg ODN 504 y 2 Suero Control proveniente de 3 pools diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 12.5µg de HA.

ENSAYO DE BINDING.

Día 1: Se colocó la membrana sobre un recipiente de poliestireno y se dispersó alcohol 70% (unas pocas gotas) hasta cubrir la totalidad de la membrana, este procedimiento aumentó la solvatación de los spots hidrofóbicos. Luego se lavó la membrana 3 veces con 10 mL de TBS (Buffer Tris 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 6.1 gr Tris Base en 1 L de agua; ajustar el pH a 7 con HCl), durante 10 min por lavado a temperatura ambiente con agitación. Finalizados los lavados, se incubó o.n. (overnight) con 10 mL de MBS (Solución de Bloqueo, 5% sacarosa, 5% SFB descomplementado en T-TBS) a 4°C.

Día 2: Se lavó la membrana con 10 mL de T-TBS (TBS mas 0.05% Tween-20) durante 10 min y se incubó durante 4 horas con el suero a testear en una única dilución (1/100) en 10 mL de MBS. Luego se lavó 3 veces durante 10 min con T-TBS y se incubó durante 2 horas con el anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina anti IgG rata (Goat anti rat IgG STAR71 Serotec) diluido en MBS (1/1000). Finalizado este tiempo, se lavó la membrana 2 veces durante 10 min con CBS. (8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 2.1 gr Ácido Cítrico

(1H<sub>2</sub>O) en 1L de agua; ajustar el pH a 7 con HCl). Luego se transfirió la membrana a otro recipiente y se agregó 10 mL de la solución de desarrollo de color (CDS): A 10 mL de CBS se agregó 50 µl de cloruro de magnesio 1M, 40 µl de BCIP\* y 60 µl MTT<sup>#</sup> (el BCIP se agregó a último momento).

\*=Se disolvió 50 mg de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato p-toluidine salt, Sigma cat. B6777) en 1 mL de N, N dimetilformamida (DMF Merck cat. 103053); luego se fraccionaron alícuotas de 50µL cada una y se almacenaron a -20°C hasta su uso. Nota: Se utilizó DMF de calidad pro análisis, el cual fue previamente testado. Para ello se agregó 10 µl de Azul de Bromofenol (BPB, Merck cat. 108122) a 1 mL de DMF. El color de la solución resultante fue amarillo-verdoso, lo cual indicó que el DMF se encontró libre de aminas y puede ser utilizado en este ensayo.

#=Solución de MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide, MTT, Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide. Sigma cat. M5655). Se disolvió 50 mg de MTT en 1 mL de 70% DMF/30% H<sub>2</sub>O; luego se fraccionó y conservó a -20°C hasta su uso.

Una vez agregada la solución CDS se incubó la membrana sin agitación 30 minutos. La reacción se frenó lavando la membrana 2 veces con PBS1x.

#### DOCUMENTACION DE LAS SEÑALES.

La documentación de las señales se realizó colocando la membrana en una bolsa plástica conteniendo PBS1x. Las señales obtenidas se documentaron mediante un scanner HP Scanjet 3770. Los Spot positivos (de color azul) fueron evaluados utilizando el software Image Pro-plus 4.5.

Luego de documentar las señales se procedió al stripping (proceso por el cual se remueven los anticuerpos que se unieron a los péptidos de la membrana, los spot).

**Nota:** De no llevarse a cabo el procedimiento de stripping inmediatamente, la membrana se dejó sumergida en PBS1X a 4°C hasta el momento que se lleve a cabo el stripping (no más de 12 h).

#### *Stripping.*

Se lavó la membrana 2 veces durante 10 min con agua destilada y se incubó con 20 mL de DMF hasta que desapareció el color azul de los spots, y cuando fue necesario se colocó la membrana 10 minutos en baño sonicador. Luego se descartó la solución y se lavó otra vez durante 10 min con 20 mL de DMF y 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada. Se preparó una solución de stripping mix A (SM-A/ Urea 8M, 1% SDS en PBS1X, 0.5% mercaptoetanol previo al uso ajustar el pH a 7 con ácido acético) y se lavó 3 veces con 20mL durante 10

min a 40°C en un baño sonicador. Luego se lavó 3 veces con una solución de stripping mix B (SM-B/ 10% ácido acético, 50% etanol y 40% H<sub>2</sub>O) seguido de 3 lavados con etanol de 10' cada uno

**Nota:** Cuando la membrana no fue reutilizada inmediatamente, se secó con aire frío (usando un secador de pelo) entre 2 (dos) láminas de papel 3MM y se guardó a -20°C en una bolsa plástica sellada.

**Observación:** Luego de cada procedimiento de stripping, con el objetivo de evaluar el estado de integridad y especificidad de la membrana, se realizó un ensayo de Binding con un pool de Suero Normal de Rata (20 animales sin inmunizar). En ninguna de las membranas testeadas con el Suero Normal se observaron spot positivos, es decir de color azul.

18. *Determinación del Título de anticuerpos inhibitorios de la hemaglutinación (IHA o HIA por sus siglas en inglés hemagglutination-inhibition antibodies).*

Básicamente, la técnica consiste en inhibir la aglutinación de los glóbulos rojos (GR). Los glóbulos rojos presentan receptor de la Hemaglutinina (RHA), de manera que cuando en el medio de reacción se agrega la Hemaglutinina (HA) purificada de la cepa viral de interés, los mismos aglutinarán. Sin embargo, si en la muestra de suero se encuentran presentes anticuerpos anti-HA, la unión específica del mismo al sitio antigénico en la molécula de HA, interferirá con el enlace de la HA viral a los receptores presentes en los glóbulos rojos, produciendo de esta manera una Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).



Los ensayos se realizaron en Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas (INEI) ANLIS Depto. de Vigilancia del Virus de Influenza Dr. Carlos G. Malbrán, bajo la supervisión de la Dra. Andrea Pontoriero y la Dra. Vilma Savy.

● De los animales inmunizados con la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V Berna se utilizó el suero de ratas adultas jóvenes proveniente 3 pools diferentes de 10 animales cada uno, inmunizados con 12.5µg HA (Suero Control) o con 0.16µgHA más 50µg ODN 504 (Grupo ODN504). El suero de las ratas ancianas proviene de 2 pools de 8 animales cada uno, inmunizados con la dosis de 12.5µg HA, en ausencia del ODN504 (Grupo Control) y en presencia del ODN 504 (Grupo ODN 504).

●De los animales inmunizados con la vacuna Fluarix<sup>®</sup> (GSK) se utilizó el suero de ratas adultas jóvenes proveniente de 2 pooles diferentes de 6 animales cada uno, inmunizados con 1µg HA (Grupo Control) o más 50µg ODN 504 (Grupo ODN504).

**ENSAYO DE IHA:** El ensayo se realizó en placas de microtitulación (fondo en V), en las cuales se sembró una cantidad constante de HA, diluciones seriadas del suero (a testear) y GR de pavo.

Día 1: Se trataron los sueros a evaluar con la enzima RDE (de sus siglas en inglés receptor destroying enzyme) que destruye inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación que pueden producir falsos positivos al interactuar con la hemaglutinina. Se incubó 0.3mL de RDE mas 0.1mL del suero toda la noche a 37°C en un baño termostatzado. Finalizado este tiempo, se incubó durante una hora a 56°C (para inactivar la enzima) y se alicuotaron y guardaron a -70°C. Cada vez que se realizó (o repitió) el ensayo se descongeló una alícuota a temperatura ambiente.

Día 2: Con el objetivo de remover las aglutininas no específicas de los sueros, se preparó una suspensión de GR de pavo al 0.5% en PBS1x pH=7.2 y se fraccionó 10mL de esta solución en tubos cónicos de 15 mL. Luego se centrifugó durante 5' a 900g, se descartó el sobrenadante y se agregó al pellet (de GR) 1mL del suero tratado (con la RDE) previamente diluido (1/10) en Solución Fisiológica, y se incubó durante una hora a 4°C agitando y vortexeando el tubo cada 10 minutos. Finalizado este tiempo, se centrifugaron los tubos y se retiró el sobrenadante cuidadosamente (suero a testear).

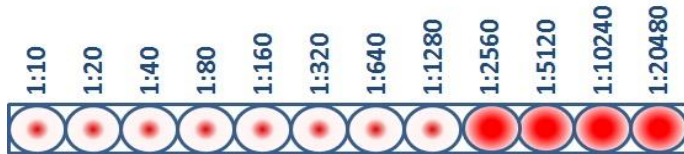
Luego se titularon los Antígenos Controles, es decir las HA de las cepas de interés (provenientes de Who Collaborating Center for Influenza Melbourne Australia). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las HA en PBS1x (volumen final 25µL) y se incubó durante 45' a temperatura ambiente con un volumen constante de la suspensión al 0.5% de GR (25µL). Una vez determinado el título del antígeno control, se realizó una dilución de manera de contener 8 unidades de HA/pocillo de reacción.

En una placa de microtitulación se realizaron diluciones seriadas de los sueros de interés en PBS1x en un volumen final de 25µL. Luego se agregó a cada pocillo 25µL del antígeno estandarizado (HA) y se homogenizó suavemente incubándose la placa 15' a temperatura ambiente. Finalizado este tiempo, se agregó 50µL/pocillo de la solución al 0.5% de GR y se incubó 45' a temperatura ambiente.

La lectura de las placas se realizó colocando las mismas de manera vertical. Se determinó como título de IHA a la inversa de la última dilución en la que se observa IHA. En todos los casos se ensayaron sueros controles de cada cepa de virus evaluada (Reference Antiserum Who Collaborating Center for

Disease Control and Prevention Atlanta, Georgia USA), como así también se testeó suero normal de rata (en el cual no se observó IHA).

A modo de ejemplo se representa un esquema de la lectura de IHA



Título de IHA= 1280

### 19. Estudio de la “Evaluación de la acción del ODN 504 en la memoria inmunológica” (Capítulo G).

Cuarenta (40) ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 6-8 semanas fueron inmunizadas con la vacuna AgB<sup>®</sup> (dosis 3µg HBsAg). A partir de los 30 días post-inmunización, se obtuvo una muestra de suero de cada animal, todos los meses durante 10-12 meses, al cual se le determinó los niveles de anticuerpos específicos anti HBsAg mediante la técnica ELISA. Los animales seleccionados fueron aquellos que presentaron una disminución en el título de anticuerpos específicos entre 3 y 4 diluciones al medio. Al mismo tiempo, se contempló durante todo el ensayo el estado clínico de los animales ya que, debido a la edad avanzada, en muchas ocasiones presentan granulomas en diferentes partes del cuerpo, por lo tanto a estos animales se los excluyó del protocolo. Teniendo en cuenta estas dos características, se formaron 3 (tres) grupos de 10 (diez) animales cada uno. Al **grupo 1** se le inoculó 4 (cuatro) dosis de 6mg de ODN 504 PS cada una en intervalos de 3 (tres) horas (Grupo ODN504), el **grupo 2** recibió Solución Fisiológica (Grupo S.F) en iguales condiciones que el grupo 1, y por último, el **grupo 3** recibió una dosis de la vacuna AgB<sup>®</sup> (control positivo) de igual composición a la primera dosis. Todos los animales recibieron el ODN 504 PS, la S.F. o la vacuna AgB<sup>®</sup> por vía sub-cutánea.

Cinco días post-última dosis, se sacrificaron todos los animales y se procesó el bazo (como se describió previamente) y la médula ósea (m.o.). Para la obtención de la m.o. (en condiciones de esterilidad) se removieron las epífisis con una tijera y luego con una jeringa de 1mL se accedió a la cavidad que contiene la m.o. y se perfundió varias veces con medio RPMI Completo. La suspensión celular obtenida se centrifugó a 2000-2500 rpm, y por último se resuspendió en 1 mL de RPMI Completo y se procedió a contar las células en cámara de Neubauer.



Del homogenato celular obtenido de cada órgano se realizó el ensayo de ELISPOT CFA (células formadoras de anticuerpos). Brevemente, en las tapas de placas de 24 pocillos (Greiner Bio-One cat. 662160) se incubó una solución de 3µg HBsAg en buffer Carbonato-bicarbonato (0,05M, pH=9,6) (130µL/pocillo) toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron las placas 3/4 veces con 25/30 mL de PBS1x y luego se bloquearon con el agregado de RPMI completo (10% S.F.B) 220µL/pocillo durante 2 h a 37°C en cámara húmeda. De cada una de las suspensiones celulares (bazo y médula), se incubaron diferentes concentraciones celulares ( $5 \times 10^7$ /mL,  $1 \times 10^7$ /mL,  $2 \times 10^6$ /mL y  $1 \times 10^6$ /mL) en un volumen de 130µL/pocillo, durante 6 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> en una cámara húmeda adaptada para tal fin. Finalizado este tiempo, las placas se lavaron exhaustivamente con PBS-T y H<sub>2</sub>O destilada 0.05% Tween 20 (H<sub>2</sub>O-T) como se describió previamente (2 PBS-T, 1 H<sub>2</sub>O-T, 2 PBS-T, 1 H<sub>2</sub>O-T, 2 PBS-T), el último lavado se realizó con PBS1x. Finalizado los lavados, las placas se incubaron con el anticuerpo IgG de cabra anti IgG de rata (Sigma R5130) 90µl/pocillo durante toda la noche a 4°C, luego se lavaron 5 veces con PBS-T y se incubaron con el anticuerpo IgG de conejo anti cabra conjugado a peroxidasa (Zymed 61-1620) (90µL/pocillo) durante 3 h a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavaron nuevamente y se agregó el sustrato *p*-Phenylenediamine (PPD, Sigma P6001) (0.8mg/mL) en agar-PBS1x al 2.5%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1% a 48°C (160µL/pocillo), y una vez agregada la solución reveladora se mantuvieron las placas en oscuridad durante 8-10 minutos hasta la visualización de los puntos o spot. La reacción se detuvo con el lavado de 25/30 mL de H<sub>2</sub>O destilada. Los puntos se contaron en una lupa binocular Nikon (094506B) y se analizaron los resultados.

## 20. Estudio de la “Evaluación de la acción del ODN 504 en Sepsis y Shock séptico” (Capítulo H).

Se utilizaron ratas machos de la cepa Sprague-Dawley de 6-8 semanas de edad conformando grupos de 6 a 10 animales cada uno, los cuales fueron inoculados con cepas de *Escherichia coli* O7K1H10 y O45K1H10. La obtención de las diferentes cepas bacterianas estuvo a cargo de la Dra. Verónica Riestchel del Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán. Las soluciones bacterianas se centrifugaron y luego se resuspendieron en PBS1x el mismo día en que se realizó la inoculación en los animales.

Se evaluaron dos esquemas de tratamiento con el ODN 504 PS: 1) previo a la inoculación de las bacterias y 2) luego de la inoculación de las bacterias.

En el esquema de tratamiento previo, 3 (tres) días antes de la inoculación de la bacterias (día -3) dos grupos de animales (**grupo 3 y 4**) recibieron 4 (cuatro) dosis de 6 mg por vía sub-cutánea del ODN 504 PS cada 3 (tres) horas, de manera que cada animal recibió 24 mg totales. Los **grupos 1 y 2** recibieron Solución

Fisiológica (S.F.) a los mismos tiempos que el grupo tratado con el ODN 504 PS.

Luego de transcurridos 3 días (día 0), se inocularon  $2.5 \times 10^9$  bacterias *Escherichia coli* cepa O45K1H10 por vía intra-peritoneal a los **grupos 1 y 3**, y a los **grupos 2 y 4** una única dosis de S.F. por vía intra-peritoneal. Cuatro días después (día 4) se sacrificaron todos los animales. Durante este período de tiempo, los animales fueron observados dos veces al día (8-9 a.m. y 16-17 p.m.) para determinar clínicamente el estado de los mismos. Se determinó el peso corporal (grs.), la presencia de porfiria (P) en los ojos o en las narinas, aumento de la temperatura (AT), decaimiento general (DG), diarrea (DR), aumento de la frecuencia respiratoria (FR) o muerte del animal (+), si los animales no presentaban ninguna sintomatología se le asignó el código ok.

En el caso que el tratamiento con el oligonucleótido fuese posterior a la inoculación de las bacterias, se utilizaron 40 animales. Los **grupos 1 y 2** (controles sin infección) estuvieron conformados por 10 animales cada uno y el **grupo 3** por 20 animales. A los animales del **grupo 1 y 2** se les inoculó al día 0 (cero) una única dosis de S.F. y al **grupo 3** se les inoculó  $1 \times 10^9$  bacterias de la cepa O45K1H10. En ambos casos las inoculaciones fueron por vía intra-peritoneal. Al día siguiente (día 1) los animales del **grupo 3** (inoculado con bacterias) fueron examinados exhaustivamente para formar dos grupos de 10 animales cada uno homogéneos en cuanto a su estado clínico (**grupos 3A y 3B**), conforme a lo descripto anteriormente.

El **grupo 3A** y el **grupo 1** (control) fueron inoculados con S.F y, los **grupos 3B** y **2** (control) recibieron el ODN 504 PS en iguales condiciones a las descriptas anteriormente (4 dosis de 6mg cada una cada 3 h por vía sub-cutánea). Cuatro días después se sacrificaron todos los animales (día 4).

El día del sacrificio se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica, las cuales fueron teñidas con anticuerpos específicos para ser evaluados por citometría de flujo (FACS). Además, se obtuvo suero para la determinación de diferentes citoquinas mediante la técnica ELISA de captura, el cual se realizó en similares condiciones a las descriptas anteriormente. Se utilizaron los siguientes pares de anticuerpos.

Anticuerpos de captura/detección y estándares.	Marca y catálogo	Concentración final.
Purified mouse anti rat IL 6 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°550644	3µg/mL
Biotin mouse anti-rat IL-6 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°550642	1.5µg/mL
Recombinant Rat IL-6	BD Pharmingen, cat n°557008	----

Purified mouse anti rat IL-10 Monoclonal Antibody.	BD Pharmingen, cat n°555083	2µg/mL
Biotin mouse anti-rat IL-10 Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°555084	0.5µg/mL
Recombinant Rat IL-10	BD Pharmingen, cat n°555113	----
Purified mouse anti rat GM-CSF	BD Pharmingen, cat n°554543	2µg/mL
Biotin mouse anti-rat GM-CSF Monoclonal Antibody	BD Pharmingen, cat n°555098	1µg/mL
Recombinant Rat GM-CSF.	BD Pharmingen, cat n°555113	-----

- Para determinar el porcentaje de Polimorfos nucleares (PMN) un pequeño volumen de sangre periférica (100 µl) se homogenizó con 5µl de heparina. Una dilución 1/10 (50 µl en 500 µl de PBS1x) fue analizado por citometría de flujo (50.000 eventos). La población de PMN fue determinada por la relación del tamaño y granulosidad (FSC-Height/SSC-Height) y se calculó el porcentaje de eventos incluidos en esta región.

- La determinación del Dímero D se realizó con sangre fresca (500µL) en buffer Citrato 3.8% p/v (300µL) (plasma) y los niveles de Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) y Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO) se realizó en el suero de los animales. Las muestras se analizaron el Hospital Interzonal General de Agudos “Pedro Fiorito” (Laboratorio Central). Para el dímero D se utilizó el kit “Dímero D en minividas” con reactivo de Biomerieux<sup>®</sup>, para la medición de TGP/TGO se utilizaron reactivos Weiner Cobas 511 Roche<sup>®</sup> en el auto-analizador Selectra<sup>®</sup> (ALT alanina amino tranferasa, determinación enzimática con fosfato de piridoxal/, ASAT aspartato amino tranferasa), los ensayos estuvieron supervisados por la Dra. Miriam Pereiro.

Con el objetivo de determinar el rango de concentración normal del dímero D y de TGP/TGO en ratas Sprague-Dawley, se determinaron los niveles de los mismos en 20 (veinte) ratas machos normales de 6-8 semanas de edad. En el caso del dímero D el rango fue calculado como el promedio + dos desvíos estándar, y para TGP/TGO el promedio ± 2 desvíos estándar. De esta manera para el dímero D el límite en animales normales fue <350ng/ml, para TGP 62 a 138 U/l y para la TGO de 132 a 349 U/l.

- El estudio de histopatología estuvo a cargo del médico patólogo Dr. Nestor Lago. El día del sacrificio (día 4) se extrajo el hígado de cada animal y se procedió a su fijación en una solución de paraformaldheído (4% en PBS1X), luego se procesaron las muestras con parafina y se realizaron cortes de 5µm los cuales fueron teñidos con hematoxilina/eosina y el colorante tigrómico (método de Masson). Con

el objetivo de evaluar las áreas de necrosis se estableció un escore semi-cuantitativo: 0= sin necrosis, 1= necrosis leve (menos de 2 focos confluyentes), 2= Necrosis moderada (dos focos confluyentes) y 3= Áreas de Necrosis (más de 3 focos confluyentes).

Para evaluar el grado de inflamación lobular el escore semi-cuantitativo aplicado fue el siguiente: 0= sin alteraciones, 1=mínimo cuestionable, 2= leve, 3= moderado y 4= intenso. Las muestras fueron evaluadas en forma ciega por el médico patólogo Dr. Nestor Lago.

#### 21. *Estudio del receptor mediante el Ensayo reporter NFκ-β Luciferasa en células Hek 293.*

Las siguientes líneas celulares fueron mantenidas en cultivo continuo en atmósfera con humedad y temperatura controladas (5% CO<sub>2</sub>; 37°C). Se trabajó con líneas celulares de riñón de embrión humano 293 (HeK 293) estables para la expresión de diferentes Toll Like Receptor humano (hTLR): Hek293-hTLR7 (células estables, transfectadas con Toll Like Receptor Humano 7); Hek293-hTLR9 (células estables, transfectadas con Toll Like Receptor Humano 9), estas líneas fueron cedidas por el grupo de investigación de M.D. Klinman. Además, se utilizó la línea celular 293-XL-hTLR9 de Invivogen (cat. 293xl-htlr9ha San Diego, USA).

Estas células crecen en forma de monocapa adherente y fueron mantenidas en medio DMEN (Dulbecco's Modified Tagle Medium Gibco, Scotland UKA) suplementado con 10% de SFB en presencia de 10µg/mL de Blasticidin S HCL (Invivogen, ant-bl-05).

Las células HEK 293-hTLR9; o hTR7 fueron plaqueadas en placas de 96 pocillos fondo plano (1-2x10<sup>4</sup> cell/well) en DMEN Completo sin antibióticos. Cuando las células se encontraban entre un 90-95% de confluencia, se transfectaron con Lipofectamina 2000 (Gibco, cat. 18324012) y los siguientes plásmidos: pGL2 NF-κβ Luc (0,04µg) (plásmido reporter) y pCMV Sport β-galactosidasa (0,12µg) para la normalización del ensayo. Al siguiente día las células fueron estimuladas con los diferentes oligonucleótidos PS o Mix en una concentración de 15µg/mL (2µM).

Luego de 24 h de estimular las células con los diferentes oligonucleótidos se lisaron y se determinó la actividad Luciferasa utilizando un kit comercial (Luciferasa Assay System E 1500, Promega, USA). Brevemente, se removió el medio de cultivo de las células y se agregó 200µL de PBS1x a cada uno de los pocillos con el fin de lavar las células. Se centrifugó la placa durante 10 minutos a 2000 rpm y se aspiró con una pipeta el máximo volumen de sobrenadante de cada uno de los pocillos, luego se agregó 50µL/pocillo del buffer de lisis a T° ambiente, previamente diluido al 1/5 en H<sub>2</sub>O destilada. Se golpeó suavemente la placa a ambos lados durante 3 minutos, transfiriendo luego el contenido de cada pocillo a

tubos eppendorf, manteniendo los mismos a 4°C. Con el objetivo de obtener una lisis total de las células los tubos fueron vortexeados durante 10-15 segundos, centrifugándose luego a 12000 rpm 15 segundos. El sobrenadante así obtenido se separó en dos tubos, uno para la medición de Luciferasa y otro para la medición de  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal), guardándose a -70° C hasta su uso.

\* *Medición de Luciferasa:* Se dispensaron 40 $\mu$ L del reactivo para el ensayo de Luciferasa en tubos polistor (catálogo EN0072 PPX), utilizando uno por cada muestra. En el momento de dar comienzo a la lectura, se agregaron 35 $\mu$ l de la muestra a cada tubo, homogenizando por pipeteo 3 veces. Las muestras fueron leídas en un luminómetro (Luminometer Hidex 425-014, Turku, Finland) durante 1 minuto. Durante todo el procedimiento de medición de las muestras, se mantuvieron los reactivos en oscuridad y a T° ambiente.

\* *Medición de  $\beta$ -gal:* Se realizó una solución 1mg/mL de ONPG (O-Nitrophenyl  $\beta$ -Galactopiranosido, Sigma cat. N1127) en buffer NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KCL-MgSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (40mM, 10mM, 1mM respectivamente) al 0,05% v/v 2-mercaptoetanol (M-6250 Sigma). Se incubaron 540 $\mu$ L de esta solución con 10 $\mu$ L de la muestra en baño maría a 37°C durante 20 minutos. Finalizado este tiempo la reacción se frenó con el agregado de 250 $\mu$ L/tubo de NaCO<sub>3</sub> 1M. Las muestras se leyeron a 420 nm en un lector de ELISA (Bio-Rad).

## 22. Western Blotting.

Para obtener las proteínas las células se levantaron sin tripsina, se lavaron con PBS 1x, se resuspendieron en el líquido residual y se les agregó Buffer de lisis (Hepes 10mM, NaCl 10mM, KCl 1mM, NaHCO<sub>3</sub> 5mM, CaCl<sub>2</sub> 1mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5mM, EDTA 5mM pH=7) con cocktail de inhibidores de proteasas diluido 1/500 (SIGMA cat P8340; concentraciones finales: 1 mM PMSF preparado fresco en metanol, 1 mM EDTA, 1mM benzamidime, 1  $\mu$ g/mL pepstatin A, 1  $\mu$ g/mL leupeptin). Se las incubó durante 10 min a 4°C y se pasaron 20 veces por aguja 29 G. Se centrifugaron 5 min a 3000 rpm (para bajar los núcleos), el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf limpio y se guardó a -20°C.

Posteriormente las muestras se cuantificaron por el método de Bradford.

Luego, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida 10% bajo condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE); para lo cual se sembraron por calle 50-100 $\mu$ g de proteína preparadas en Buffer de siembra (pH 6.9) y desnaturalizadas calentando a 95°C durante 5 min. Además, se sembró un marcador de peso molecular (Full Range Rainbow, RPN800, Amersham Biosciences). La corrida electroforética se realizó en Buffer de corrida 0.5X (Solución madre: Tris-HCl, Glicina, SDS10X) a 200V

y se detuvo 10 min después de la caída del frente de corrida. La transferencia a la membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences) se hizo en Buffer de transferencia (Tris 25mM, Glicina 190mM, Metanol 20%; pH=8) a 150 mA, durante toda la noche a 4°C. Luego de verificar la correcta transferencia de las proteínas, tiñendo la membrana con Rojo Ponceau (Sigma P-7170), se la dejó bloqueando a 4°C en una solución de leche descremada 5% en PBS1x-Tween 0.1% (de ahora en adelante PBS-T) hasta el día siguiente. A continuación, se enjuagó la membrana con PBS-T y se la incubó con el anticuerpo primario Rat anti human TLR9h (eBioscience, catálogo 14-9099-82), diluido 1/250, como control se utilizó el anticuerpo Mouse anti tubulin (Zymed Laboratories, catálogo 13-8000) diluido 1/500 en leche descremada 2.5%-PBS-T durante 1h con agitación y a T.A. Transcurrido este tiempo, se hizo un lavado de 15 min con PBS-T, otros 3 lavados de 5 min (los 4 lavados con agitación a temperatura ambiente) y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rabanita Rabbit anti rat IgG-HRP (Sigma A, catálogo A5795), diluido 1/500 en leche descremada 2.5%-PBS-T, durante 1h con agitación y a temperatura ambiente. Luego de una nueva serie de lavados (iguales que los anteriores), se reveló la membrana por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL (Amersham Biosciences catálogo GERPN2209) y placas radiográficas (Hyperfilm ECL, Amersham).

### *23. Tinción intracelular indirecta de TLR9h.*

Se plaquearon  $1 \times 10^6$  células Hek TLR9 o XL-hTLR9/pocillo en placa de 96 pocillos fondo en U. Luego de un día de cultivo se lavaron con PBS 1x y se fijaron con 100µl de PBS 1x-formaldehído 1% durante 20min a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con 200µl de PBS 1x. Se incubaron las células durante 20 min en medio de permeabilización (PBS 1x, 10% SFB y 0,15% Tritón X-100), se centrifugaron y se resuspendieron cuidadosamente en 80µL de solución de Anticuerpo anti hTLR9 (IMGENEX catálogo IMG-305 isotipo IgG1) o con el control de isotipo (anti GM-CSF de rata BD Pharmingen, catálogo 555099, isotipo IgG1 y misma concentración) realizada en medio de permeabilización (75µL medio + 5µL Ac). Se incubaron 30 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con medio permeabilizante. Luego, se resuspendieron las células en 80µl de una dilución 1:60 (hecha en medio de permeabilización) de Fab de conejo anti IgG de ratón-PE (Serotec, catálogo STAR12B). Se incubaron 30 min a temperatura ambiente y se lavaron 3 veces con medio permeabilizante. A continuación, se resuspendieron en 300µL de PBS 1x y se leyeron en un Citómetro de Flujo (FACScan, BD Biosciences Immunocytometry Systems). Los datos se analizaron con el programa de computación Win MDI 2.8.

## *Resultados*

## Capítulo A.

### Identificación de oligonucleótidos no-CpG con actividad inmunoestimulante *in vitro* en humanos.

Durante el curso de este estudio, donde el objetivo principal fue identificar nuevas secuencias inmunoestimulantes, encontramos en la literatura especializada al oligonucleótido (ODN) CpG 2006 como el ODN con mayor actividad en humanos. Este oligonucleótido, descrito por Krieg and Hartmann (64), poseía todas sus uniones internucleótidos del tipo fosfotioato (PS). Este tipo de unión garantiza una menor degradación por las nucleasas, al mismo tiempo que evita interferencias en el ensayo de proliferación por incorporación con Timidina tritiada (Ti-H<sup>3</sup>). El ODN CpG 2006 lo utilizamos como control positivo y como control negativo utilizamos un ODN denominado 21, el cual fue diseñado por nosotros en base a la secuencia del ODN CpG 2006 pero con sus pares CpG invertidos.

Se evaluó la capacidad inmunoestimulante de ambos oligonucleótidos (ODN's) en células mononucleares proveniente de sangre periférica humana (CMSP), mediante los ensayos de proliferación por incorporación de timidina tritiada, y por determinación de IL-6 e IgM en sobrenadantes de cultivo.

Sorpresivamente nos encontramos que el supuesto control negativo, el ODN 021 (no-CpG), poseía actividad inmunoestimulante en CMSP humana, no presentando diferencias significativas cuando se lo comparó con el control positivo, el ODN CpG 2006.

**Tabla A1. Comparación de la actividad inmunoestimulante entre el ODN CpG 2006 y su respectivo control no-CpG: ODN 021.**

ODN (PS)	Secuencia (5' ---> 3')	Índice de Proliferación			IL6 (pg/mL)			IgM (ng/ml)		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
ODN 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	17.95	22	2.39	215.8	5	82.4	4909	5	258
ODN 021	TGCTGCTTTTTGTGCTTTTGTGCTT	15.25	25	2.74	171.3	5	49.9	4200	5	149
Medio (RPMI)	---	1.00	25	2.14	<39	5	n/a	230	5	98

El promedio mostrado proviene de N ensayos realizados con CMSP proveniente de donantes diferentes. El índice de proliferación fue calculado por cuadruplicado, IL-6 e IgM por duplicado. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN's de 0,375 µg/ml para los ensayos de proliferación, 6 µg/ml en la medición de IL-6 y 1,5 µg/ml para IgM. Uniones internucleótidos fosfotioato (PS). Los dinucleótidos CG se encuentran subrayados y los GC (CG invertidos) doble subrayados.

El “motivo óptimo CpG” inmunoestimulante descrito por Krieg en humanos responde a la secuencia GTCGTT, el ODN CpG 2006 posee tres de “estos motivos CpG” (en negrita), y cuatro pares de dinucleótidos CG (delineados) CGTCGCTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT. En función de la actividad



observada por el ODN 21, sin motivos CpG, nuestro próximo objetivo fue investigar el motivo no-CpG responsable de la activación observada. Para ello comenzamos modificando sistemáticamente las bases que componían los pares CG del ODN CpG 2006, de esta manera se testeó el índice de proliferación por incorporación de timidina tritiada y la producción de IL-6 e IgM en sobrenadantes de cultivo de células estimuladas con los ODN's modificados. Se observó que las "G" del par CG no son necesarias para estimular las células provenientes de CMSP (oligonucleótidos 504, 505 y 506). Sin embargo, cuando se modificó la "C" del par CG existe una marcada disminución de la actividad inmunoestimulante (ODN's 501, 502 y 503), tabla A2.

**Tabla A2. Inducción de la proliferación celular, producción de IL-6 e IgM en CMSP humanas al ser estimuladas por variantes no-CpG del ODN 2006.**

ODN (PS)	Secuencia (5' ---> 3')	Índice de Proliferación			IL6 (pg/mL)			IgM (ng/ml)		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
ODN 2006	<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	13.83	14	1.55	215.8	8	83.8	5200.8	8	258.0
ODN 501	<u>T</u> <u>A</u> G <u>T</u> A <u>G</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> <u>A</u> G <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> <u>A</u> G <u>T</u> T	5.42	8	2.03	66.8	8	54.0	3128.0	8	90.5
ODN 502	<u>T</u> G <u>G</u> T <u>G</u> G <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> <u>G</u> G <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> <u>G</u> G <u>T</u> T	7.16	8	3.24	89.7	8	91.4	2682.0	8	130.2
ODN 503	<u>T</u> T <u>G</u> <u>T</u> T <u>G</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> <u>T</u> T	9.87	8	1.90	334.9	8	215.4	2893.0	8	123.0
ODN 504	<u>T</u> C <u>A</u> T <u>C</u> A <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> C <u>A</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> C <u>A</u> T	13.08	8	3.80	285.2	8	39.5	6220.5	8	116.7
ODN 505	<u>T</u> C <u>C</u> T <u>C</u> C <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> C <u>C</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> C <u>C</u> T	12.98	8	4.73	218.9	8	3.1	4150.0	8	70.7
ODN 506	<u>T</u> C <u>T</u> T <u>C</u> T <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> C <u>T</u> T <u>T</u> T <u>T</u> G <u>T</u> C <u>T</u> T	11.66	8	2.77	228.9	8	161.0	4324.7	8	221.1
Medio (RPMI)	---	1.00	12	1.87	<39	10	n/a	151	8	79

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los dinucleótidos CG del ODN 2006 se encuentran subrayados y, los cambios en las secuencias con respecto al ODN 2006 se muestran doble subrayados. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml para los ensayos de proliferación, 6 µg/ml en la medición de IL-6 y 1,5 µg/ml para IgM.

Estos resultados demuestran, que al menos en las actividades ensayadas, la integridad del par CG no es necesaria.

### Determinación del motivo inmunoestimulante.

Hasta aquí determinamos que, para que un oligonucleótido tenga actividad inmunoestimulante en humanos, no es necesaria la presencia de dinucleótidos CG. En consecuencia, el siguiente objetivo fue determinar el motivo o la secuencia consenso no CpG que genera la actividad inmunoestimulante en células mononucleares de sangre periférica humana.

Para ello, tomamos como prototipo a uno de los ODN's no CpG que presentó actividad inmunoestimulante *in vitro* y se realizaron diferentes modificaciones que consistieron en reemplazar sistemáticamente los nucleótidos presentes en los dos motivos CATTTTGT del ODN 504, y se determinó el índice de proliferación en CMSP.

Los ODN's 531, 532 y 533 muestran los cambios simultáneos realizados en la posición número 1 (uno) de los dos motivos. Como se observa en la tabla A3, cuando este cambio corresponde a una base púrica, A o G (ODN 531, 533), la actividad disminuye aproximadamente un 50%. Sin embargo, no se observa una disminución en la actividad cuando la sustitución es por una base pirimidínica (ODN 532). Este resultado nos estaría indicando que el nucleótido correspondiente a la posición número 1 del motivo debería ser una base pirimidínica, C o T.

Los cambios realizados en la segunda posición del motivo corresponden a los ODN's 534 y 535, en esta posición solo se pudieron realizar sustituciones con los oligonucleótidos C o T debido a que se evitó la sustitución del nucleótido G para no introducir pares CG. Con ninguna de las dos modificaciones se observó una disminución en la actividad proliferativa, por lo tanto la posición número 2 (dos) del motivo puede ser ocupada por una A (ODN 504), una C (ODN534) o una T (ODN 535).

**Tabla A3. Influencia de los nucleótidos pertenecientes a la primera y segunda posición del motivo del ODN 504 en la actividad inmunoestimulante medida a través del índice de proliferación celular.**

ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación		
		Promedio	N	SD
<b>ODN 504</b>	TCAT <b>C</b> ATTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATT	13.85	16	4.36
ODN 531	TCATA <b>A</b> ATTTT <b>G</b> TAATTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATT	7.59	12	2.71
ODN 532	TCAT <b>T</b> ATTTT <b>G</b> T <b>T</b> ATTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATT	13.80	12	3.41
ODN 533	TCAT <b>G</b> ATTTT <b>G</b> T <b>G</b> ATTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATT	6.20	12	2.71
ODN 534	TCAT <b>C</b> CTTTT <b>G</b> TCCTTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATT	11.67	12	4.49
ODN 535	TCAT <b>T</b> CTTTT <b>G</b> T <b>C</b> TTTTT <b>G</b> T <b>C</b> ATT	12.49	12	2.51
Medio (RPMI)	---	1.00	16	2.56

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias con respecto al ODN 504 se muestran en negrita. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml.

Para poder estudiar la influencia de la G en la segunda posición del motivo, se diseñaron ODN's conservando una T en la primera posición del motivo en función de los resultados observados con el ODN 532. En la tabla A4 se muestran los resultados de los ODN's conservando una T, una G o una C en la segunda posición del motivo (ODN 197; 198 y 199).

**Tabla A4. Influencia de los nucleótidos pertenecientes a la segunda posición del motivo del ODN 504 en la actividad inmunoestimulante.**

ODN (PS)	Secuencia (5' ---> 3')	Índice de Proliferación		
		Prom.	N	SD
<b>ODN 504</b>	TCAT <b>C</b> ATTTT <b>G</b> TCATTTT <b>G</b> TCATT	14.21	15	3.46
ODN 532	TCAT <b>A</b> ATTTT <b>G</b> TTATTTT <b>G</b> TCATT	10.10	4	1.61
ODN 197	TCAT <b>T</b> TTTTT <b>G</b> TTTTTT <b>G</b> TCATT	10.84	4	1.06
ODN 198	TCAT <b>G</b> TTTTT <b>G</b> TTGTTTT <b>G</b> TCATT	10.00	4	1.75
ODN 199	TCAT <b>T</b> CTTTTT <b>G</b> TTCTTTT <b>G</b> TCATT	12.36	3	1.71
Medio (RPMI)	---	1.00	15	1.98

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias se muestran en negrita. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml.

Los resultados demostraron que independientemente del oligonucleótido utilizado como molde, ODN 504 u ODN 532, la segunda posición del motivo puede ser ocupada por una base púrica (A o G) o pirimidínica (C o T), o sea cualquier nucleótido (N).

El siguiente análisis comenzó con la modificación sistemática de cada una de las cuatro T consecutivas presentes en el motivo del ODN 504, correspondientes a la posición número 3, 4, 5 y 6. Los reemplazos en cada una de estas posiciones estuvieron representados por el diseño de tres ODN's donde cada uno de ellos conservó la sustitución de la T por una A, una C o una G. El reemplazo en la posición número 3 (tres) de la T por una A (ODN 537) fue neutro, sin embargo los reemplazos en esta posición por una C (ODN 595) o una G (ODN 600) resultaron en una disminución de la actividad inmunoestimulante, tabla A5. Por lo tanto, los nucleótidos que ocupen esta posición deberían ser una T o una A (T/A).

**Tabla A5. Influencia de la modificación de las cuatro T consecutivas del motivo del ODN 504 en la actividad inmunoestimulante.**

ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación		
		Promedio	N	SD
<b>ODN 504</b>	TCAT <b>C</b> ATTT <b>T</b> GTCATTT <b>T</b> GTCATT	14.85	12	2.45
ODN 537	TCAT <b>C</b> AATTT <b>T</b> GTC <b>A</b> ATTT <b>T</b> GTCATT	14.31	12	4.03
ODN 595	TCAT <b>C</b> ACTTT <b>T</b> GTC <b>A</b> CTTT <b>T</b> GTCATT	9.16	15	2.30
ODN 600	TCAT <b>C</b> AGTTT <b>T</b> GTC <b>A</b> GTTT <b>T</b> GTCATT	7.38	12	2.69
ODN 538	TCAT <b>C</b> CATATT <b>T</b> GTC <b>A</b> TATT <b>T</b> GTCATT	7.80	16	3.38
ODN 596	TCAT <b>C</b> CAT <b>C</b> TT <b>T</b> GTC <b>A</b> T <b>C</b> TT <b>T</b> GTCATT	12.61	20	3.37
ODN 601	TCAT <b>C</b> CAT <b>G</b> TT <b>T</b> GTC <b>A</b> T <b>G</b> TT <b>T</b> GTCATT	11.47	8	1.35
ODN 539	TCAT <b>C</b> ATT <b>A</b> T <b>G</b> CATT <b>A</b> T <b>G</b> CATT	5.63	16	3.52
ODN 597	TCAT <b>C</b> ATT <b>C</b> T <b>G</b> CATT <b>C</b> T <b>G</b> CATT	13.98	20	3.78
ODN 602	TCAT <b>C</b> ATT <b>G</b> T <b>G</b> CATT <b>G</b> T <b>G</b> CATT	13.23	20	3.47
ODN 540	TCAT <b>C</b> ATT <b>A</b> G <b>T</b> CATT <b>A</b> G <b>T</b> CATT	9.62	16	3.47
ODN 603	TCAT <b>C</b> ATT <b>G</b> G <b>T</b> CATT <b>G</b> G <b>T</b> CATT	13.91	20	3.35
Medio (RPMI)	---	1.00	20	3.10

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias se muestran en negrita. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml.

Resultados diferentes encontramos con respecto a los nucleótidos que ocupan la posición número 4 (cuatro) del motivo. En esta posición se observa una pérdida de la actividad cuando se reemplaza la T por una A (ODN 538), siendo neutro el cambio cuando se reemplaza por una C (ODN 596) o por una G (ODN 601). Así, la posición número 4 del motivo debería estar ocupada por una T, C o G (T/C/G).

En la posición número 5 (cinco) del motivo, encontramos resultados similares a la posición número 4. Los reemplazos de la T por la C (ODN 597) o por la G (ODN 602) no reflejaron una pérdida de la actividad. En cambio, cuando se sustituye la T por una A (ODN 539) se observó una disminución de la misma. En conclusión, preferentemente esta posición al igual que la posición número cuatro, debería ser ocupada por una T, C o G (T/C/G).

En el análisis de la posición número 6 (seis) del motivo, última T de esta serie, sólo pudimos llevar a cabo dos modificaciones debido a que en la posición número siete del motivo hay una G. Nosotros observamos que esta posición podría ser reemplazada por una G (ODN 603) y conservar aún la actividad. Sin embargo, una leve disminución en la actividad se observó cuando esta posición fue ocupada por una A (ODN 540). Por lo tanto la posición número 6 debería ser ocupada por una T o por una G (T/G).

El reemplazo del nucleótido G ubicado en la posición número 7 (siete) del motivo por una A (ODN 541) o por una T (ODN 542), tabla A6, reflejó una leve disminución en la actividad inmunoestimulante. Sin embargo, una drástica disminución se observó en esta posición cuando se reemplazó la G por la C (ODN 543). En función de este resultado nosotros pensamos que esta posición debería estar ocupada por un único nucleótido, la Guanina (G).

Los resultados más bajos en cuanto a la actividad inmunoestimulante los encontramos cuando modificamos la posición número 8 (ocho) del motivo. Independientemente de la sustitución realizada, la T por la A (ODN 544), por la C (ODN 599) o por la G (ODN 604) todas las modificaciones reflejaron una drástica disminución de la actividad proliferativa. Estos resultados sugieren que la posición número 8 debería ser exclusivamente ocupada por el nucleótido de timina (T).

**Tabla A6. Influencia de la modificación de los nucleótidos GT, ubicados en la posición número 7 y 8 del motivo *CATTTTGT* en la actividad inmunoestimulante.**

ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación	N	SD
		Promedio		
<b>ODN 504</b>	TCAT <b>CATTTT</b> GCATTT <b>GT</b> CATT	14.37	12	2.85
ODN 541	TCAT <b>CATTTT</b> ATCATTT <b>T</b> ATCATT	9.30	12	2.20
ODN 542	TCAT <b>CATTTT</b> TTTCATTT <b>T</b> TCATT	9.78	12	2.60
ODN 543	TCAT <b>CATTTT</b> CTCATTT <b>T</b> CTCATT	4.75	12	2.25
ODN 544	TCAT <b>CATTTT</b> GACATTT <b>T</b> GACATT	4.27	12	1.30
ODN 599	TCAT <b>CATTTT</b> GCCATTT <b>T</b> GCCATT	5.39	16	1.98
ODN 604	TCAT <b>CATTTT</b> GGCATTT <b>T</b> GGCATT	7.60	16	2.63
Medio (RPMI)	---	1.00	16	2.35

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias se muestran en negrita. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml.

Los cambios realizados en ambos motivos del ODN 504 demostraron que la secuencia que mejor define al motivo esta representada de la siguiente manera: la primera posición ocupada por una base pirimidínica, la segunda posición por cualquier nucleótido del ADN (A/T/C/G), la tercera posición por una T o una A (T/A), la cuarta y quinta posición por una T, C o G (T/C/G), la sexta posición por una T o G (T/G), la séptima posición por un único nucleótido la guanina (G), y por último, la octava posición exclusivamente por la timina (T), de esta manera el motivo responde a la siguiente fórmula canónica:

	Py	N	(T/A)	(T/C/G)	(T/C/G)	(T/G)	G	T
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Posición:	1 <sup>era</sup>	2 <sup>da</sup>	3 <sup>era</sup>	4 <sup>ta</sup>	5 <sup>ta</sup>	6 <sup>ta</sup>	7 <sup>ma</sup>	8 <sup>va</sup>

Donde Py, es una base pirimidínica citosina o timina, N representa cualquier desoxirribonucleótido y entre paréntesis los nucleótidos que presentan mayor actividad inmunoestimulante.

El siguiente análisis consistió en determinar la influencia de los cambios simultáneos de la serie de las cuatro T's consecutivas (de los dos motivos CATT<sup>4</sup>TGT), correspondientes a las posiciones número 3, 4, 5 y 6 del ODN no CpG prototipo, el ODN 504. En la tabla A7 puede observarse que las sustituciones en las posiciones 3 y 6, no resultaron en la pérdida de la actividad inmunoproliferante (ODN 608), por lo tanto estas posiciones pueden ser reemplazadas por una A y una G respectivamente. Sin embargo, cuando las modificaciones se realizaron en las posiciones 3, 4 y 6 (ODN 609, ODN 610) se observó una disminución de la actividad, indicando que la posición número 4 es más frágil en cuanto a la sustitución de la T. Cabe destacar que la susitución de la T por G en la posición número 4 (ODN 611), es mas crítica que las sustituciones por A o C en la misma posición.

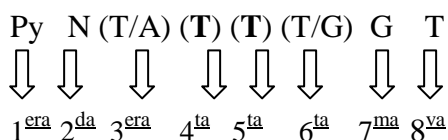
Por último, el reemplazo de las tres T's correspondientes a las posiciones 3, 5 y 6 (ODN's 612 y 614) resultaron en una significativa pérdida de la actividad. Teniendo en cuenta estos resultados podemos concluir que las posiciones 4 y 5 del motivo deberían estar ocupadas por T's para conservar la máxima actividad inmunoestimulante.

**Tabla A7. Análisis de la influencia de las T's de las posiciones 3, 4, 5 y 6 del motivo *CATTTTGT* en la actividad inmunoestimulante.**

ODN (PS)	Secuencia (5' ---> 3')	Índice de Proliferación			Posiciones modificadas del motivo
		Promedio	N	SD	
<b>ODN 504</b>	TCAT <b>CATTTT</b> GT <b>CATTTT</b> GT <b>CATT</b>	13.28	12	2.15	
ODN 608	TCAT <b>CAATTGGT</b> CAATTGGTCATT	12.98	12	2.22	3 y 6
ODN 609	TCAT <b>CAAATGGT</b> CAAATGGTCATT	8.58	12	1.53	3, 4 y 6
ODN 610	TCAT <b>CAACTGGT</b> CAACTGGTCATT	9.07	12	1.95	3, 4 y 6
ODN 611	TCAT <b>CAAGTGGT</b> CAAGTGGTCATT	5.97	12	1.79	3, 4 y 6
ODN 612	TCAT <b>CAATAGGT</b> CAATAGGT <b>CATT</b>	3.15	12	0.75	3, 5 y 6
ODN 614	TCAT <b>CAATGGGT</b> CAATGGGT <b>CATT</b>	5.18	12	1.54	3, 5 y 6
Medio (RPMI)	---	1.00	12	1.82	

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias se muestran en negrita. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml.

Este análisis nos condujo a re-definir la composición del motivo de la siguiente manera:



Posición:

Siendo Py una base pirimidínica citosina o timina, N cualquier desoxirribonucleótido y entre paréntesis los nucleótidos que presentaron mayor actividad inmunoestimulante, donde al menos dos de estas posiciones deben estar ocupadas por T's, siendo más críticas las posiciones número 4 y 5. El ODN no CpG prototipo utilizado por nosotros fue el ODN 504 cuyo motivo *CATTTTGT* responde a la fórmula canónica *PyNTTTTGT*.

Cuando se realizaron dos o más modificaciones de la T's que se encuentran en las posiciones número 4, 5, 6 y 8 dentro del motivo, se observó que los ODN's que poseen estas modificaciones perdieron gran parte de la capacidad de inducir la proliferación de CMSP (aproximadamente queda una actividad remanente del 25% con respecto al ODN 504). Las modificaciones realizadas en las posiciones 4, 5 y 8 (ODN 550) y en las 4, 5, 6 y 8 (ODN 551), reflejaron una marcada reducción de la proliferación presentando aproximadamente un promedio del 15% de actividad, como se observa en la tabla A8.

Tabla A 8. Influencia del reemplazo de dos o más T's por A en el motivo *CATTTTGT*.

ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación			Posiciones modificadas del motivo
		Promedio	N	SD	
ODN 504	TCAT <u>CATTTT</u> GT <u>CATTTT</u> GT CATT	13.45	12	1.55	
ODN 547	TCAT <u>CATATT</u> GACATATTGACATT	3.34	12	1.16	4 y 8
ODN 546	TCAT <u>CATTAT</u> GACATTAGACATT	2.90	12	1.16	5 y 8
ODN 545	TCAT <u>CATT</u> TAGACATTTAGACATT	4.19	12	1.81	6 y 8
ODN 550	TCAT <u>CATAAT</u> GACATAATGACATT	1.91	12	0.71	4, 5 y 8
ODN 549	TCAT <u>CATAT</u> AGACATATAGACATT	3.51	12	1.03	4, 6 y 8
ODN 548	TCAT <u>CATTA</u> AAGACATTAAGACATT	3.40	12	1.53	5, 6 y 8
ODN 551	TCAT <u>CATAA</u> AAGACATAAAGACATT	2.17	12	0.72	4, 5, 6 y 8
Medio (RPMI)	---	1.00	12	1.82	

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias se muestran en negrita. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml.

El conocimiento de las bases nucleotídicas que componen el motivo de un oligonucleótido no CpG también nos permitió diseñar un oligonucleótido con baja actividad inmunoestimulante para ser utilizado en los diferentes ensayos como control negativo. De esta manera, diseñamos el ODN 22 el cual carece de actividad inmunoestimulante sobre células mononucleares de sangre periférica humana, tabla A9.

Tabla A9. Comparación de la actividad inmunoestimulante del ODN CpG 2006, de los ODN's no CpG 21, 504 y del ODN 22 como control negativo.

ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación			IL6 (pg/mL)			IgM (ng/ml)		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
ODN 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTIGTCGTT	13.9	5	1.2	222.5	5	83.4	776	5	214
ODN 021	TGCTGCTTTTTGTGCTTTTGTGCTT	12.6	5	1.1	258.7	5	57.6	675	5	198
ODN 504	TCATCATTTTGT <u>CATTTT</u> GT <u>CATT</u>	13.8	5	0.8	298.6	5	49.2	779	5	208
ODN 022	TGCTGCAAAAGAGCAA <u>AAAGAG</u> CAA	1.1	5	0.9	<39	5	—	115	5	110
Medio (RPMI)	---	1.00	5	0.8	<39	5	—	121	5	98

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias con respecto al ODN 2006 se muestran subrayados. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml para los ensayos de proliferación, 6 µg/ml en la medición de IL-6 y 1,5 µg/ml para IgM.

Una vez definidas las bases nucleotídicas que mejor definen al motivo no CpG, el siguiente análisis consistió en determinar la composición de nucleótidos fuera del motivo. Para ello, se realizaron



sustituciones nucleotídicas en los extremos 5' y 3' del ODN 504. En la tabla A10, se puede observar que ninguno de los cambios realizados en la 1<sup>era</sup>, 2<sup>da</sup>, 3<sup>era</sup> y 4<sup>ta</sup> posición en el extremo 5' (ODN's 559 a 570) reflejaron una pérdida significativa en las actividades inmunoestimulantes observadas (proliferación o secreción de IL-6).

**Tabla A10. Determinación de la composición nucleotídica en el extremo 5' fuera del motivo PyNTTTTGT.**

ODN (PS)	Secuencia (5' ---> 3')	Índice de Proliferación			IL-6 (pg/ml)		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
ODN 504	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	13.0	8	0.9	171	2	14
ODN 559	ACATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	13.4	4	1.0	128	3	3
ODN 560	CCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	12.1	4	0.9	145	4	32
ODN 561	GCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	9.5	4	1.1	209	4	74
ODN 562	TAATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	12.4	4	1.5	171	4	24
ODN 563	TTATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	11.1	3	0.7	172	4	63
ODN 564	TGATC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	12.8	4	0.9	118	4	38
ODN 565	TCCTC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	14.1	4	0.5	135	4	25
ODN 566	TCTTC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	13.9	4	2.2	157	4	28
ODN 567	TCGTC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	12.9	4	0.7	259	4	25
ODN 568	TCAAC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	10.3	4	1.1	153	4	35
ODN 569	TCACC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	15.0	4	1.2	199	3	12
ODN 570	TCAGC <u>ATTTT</u> GTCATTTTGCATT	12.5	4	0.4	181	3	2
ODN 022	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	1.4	12	0.7	<39.9	4	-
Medio (RPMI)	---	1.00	12	0.8	<39.9	4	-

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias con respecto al ODN 2006 se muestran subrayados. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml para los ensayos de proliferación y 6 µg/ml en la medición de IL-6.

Resultados similares fueron obtenidos cuando se realizaron las sustituciones en el extremo 3' fuera del motivo, tabla A11 (ODN's 571 a 582).

Tomando en conjunto estos resultados podemos concluir que ninguna de las modificaciones realizadas en los extremos 5' y 3' fuera del motivo reflejaron una marcada influencia en la actividad inmunoestimulante.

Tabla A11. Determinación de la composición nucleotídica en el extremo 3' fuera del motivo PyNTTTGT.

ODN (PS)	Secuencia (5' ---> 3')	Índice de Proliferación			IL-6 (pg/ml)		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
<b>ODN 504</b>	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> ATT	12.5	4	0.8	185	4	31
ODN 571	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTA</u> AATT	14.2	4	0.7	163	4	26
ODN 572	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTT</u> AATT	13.2	4	1.4	182	3	67
ODN 573	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTG</u> AATT	12.7	4	0.7	177	4	29
ODN 574	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> CTT	11.8	4	0.7	179	3	58
ODN 575	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> TTT	10.8	4	0.8	150	3	47
ODN 576	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> GTT	12.6	4	1.1	202	4	55
ODN 577	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> AAAT	10.0	4	1.4	243	3	11
ODN 578	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> ACT	10.9	4	0.9	213	4	9
ODN 579	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> AGT	10.7	4	1.7	182	4	18
ODN 580	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> ATA	11.7	4	1.4	194	4	36
ODN 581	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> ATC	10.7	4	1.0	173	4	18
ODN 582	TCATC <u>ATTTT</u> GTCATTTT <u>GTC</u> ATG	12.1	4	0.8	242	4	31
ODN 022	TGCTGCAA <u>AA</u> GAGCAA <u>AA</u> GAGCAA	1.3	4	0.8	<39.9	4	-
Medio (RPMI)	---	1.00	4	0,7	<39.9	4	-

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Desvío Estándar (SD). Los cambios en las secuencias con respecto al ODN 2006 se muestran subrayados. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml para los ensayos de proliferación y 6 µg/ml en la medición de IL-6.

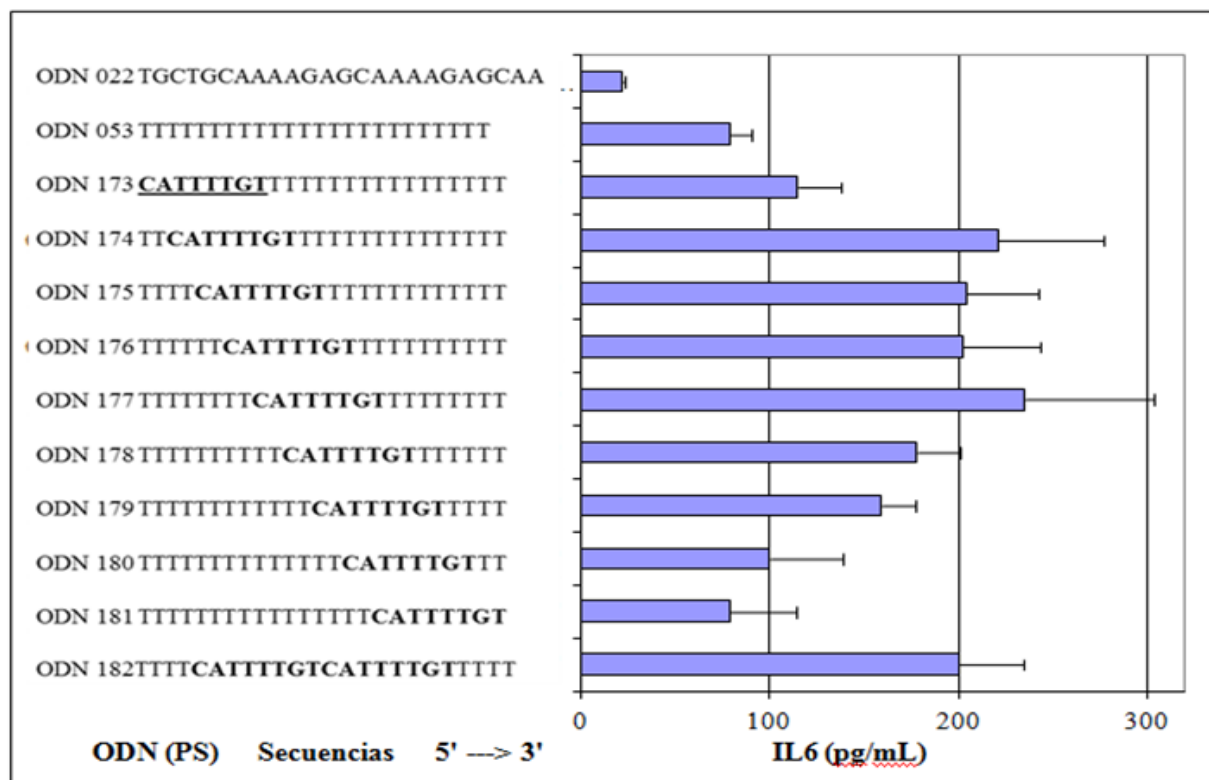
Con el propósito de determinar si la posición del motivo “CATTTTGT” perteneciente al ODN 504 es crítica en cuanto a la actividad inmunoestimulante, se diseñaron oligonucleótidos en los cuales se introdujo el motivo en diferentes posiciones dentro de un esqueleto de 24 nucleótidos de Timinas (poly T). En la figura A1 se puede observar que el oligonucleótido poly T (denominado ODN 53) presenta actividad en CMSP humanas. Este ODN respeta todas las modificaciones beneficiosas que se pueden realizar en el motivo definido por nosotros, a excepción de la posición número 7 (siete) que, como mencionamos anteriormente debe contener exclusivamente una G y el ODN 53 posee una T en esta posición del motivo. Sin embargo, la introducción de un motivo CATTTTGT dentro de la cadena de poly T incrementó su actividad aproximadamente 2.5 a 3.5 veces (ODN 173).

Un aumento significativo en la actividad inmunoestimulante se observó a partir de la ubicación del motivo, como mínimo, a 2 (dos) nucleótidos del extremo 5' (ODN 174). Este aumento en la actividad persiste aún cuando el motivo se ubica a 10 (diez) o 12 (doce) nucleótidos del extremo 5', ODN 178 y 179 respectivamente. La disminución en la actividad inmunoestimulante se observó cuando el motivo se ubica próximo al extremo 3' (ODN's 180 y 181).

En función de los resultados encontrados podemos determinar que la posición óptima del motivo se encuentra aproximadamente en la porción central del oligonucleótido.

Por otra parte, el agregado de un segundo motivo no parece incrementar la actividad inmunoestimulante (ODN 182).

**Figura A1. Influencia de la posición del motivo *PyNTTTTGT* en un esqueleto de 24 nucleótidos de longitud.**



Efecto de la posición del motivo CATTITGT perteneciente al ODN 504 en un oligonucleótido de 24 nucleótidos de longitud. El promedio (Prom.) de IL-6(pg/mL) fue calculado a partir de 8 ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 6 µg/ml.

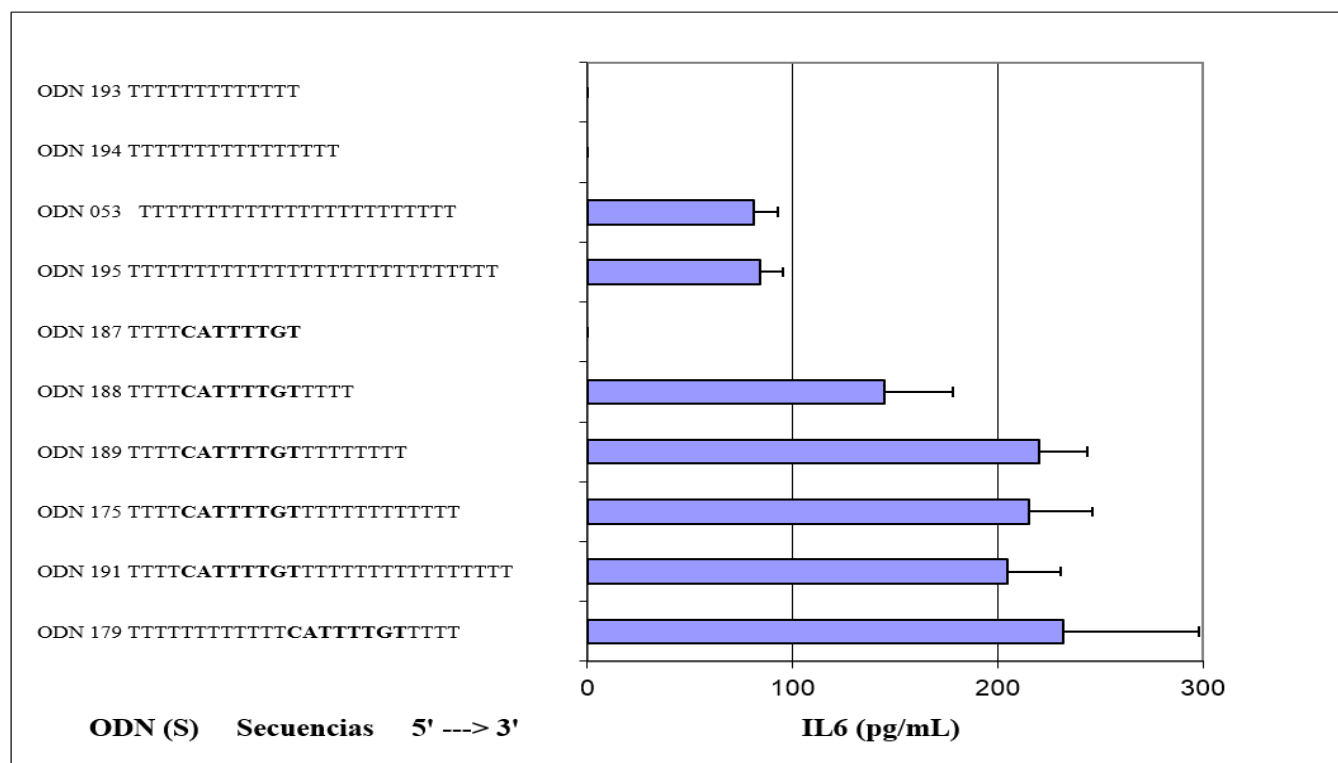
Hasta aquí hemos determinado la composición nucleotídica del motivo activo, la constitución circundante de nucleótidos en los extremos 5' y 3' y la ubicación del motivo dentro de un esqueleto de 24 oligonucleótidos. El siguiente objetivo fue determinar la mínima longitud que debe poseer un oligonucleótido para ejercer su actividad en CMSP humanas. Para ello, se introdujo el motivo CATTITGT del ODN 504 en cadenas poli T de diferente longitud.

Como se observa en la figura A2, la mínima longitud que debe poseer un oligonucleótido con un motivo activo debe ser de 16 oligonucleótidos (ODN 188). La máxima actividad se observó con oligonucleótidos de 20 mer de longitud (ODN 189). Cabe destacar que el ODN 194 el cual posee en su secuencia 16 nucleótidos de Timina no presenta actividad en cuanto a la secreción de IL-6, a diferencia de

lo observado con el ODN 188 el cual posee la misma longitud pero con un motivo activo *PyNTTTTGT* en la posición central.

El oligonucleótido de menor tamaño testeado por nosotros fue de 12 nucleótidos conteniendo un motivo (ODN 187). La falta de actividad de este oligonucleótido no solo debe atribuirse a su longitud, ya que el motivo se encuentra en el extremo 3' y esta ubicación se demostró que era perjudicial.

**Figura A2. Tamaño mínimo de oligonucleótidos con el motivo *PyNTTTTGT* con actividad inmunoestimulante.**



Efecto de la longitud de un oligonucleótido poli T conteniendo el motivo CTTTTGT perteneciente al ODN 504. El promedio (Prom.) de IL-6 (pg/mL) fue calculado a partir de 6 ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforotioato (PS). Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 6 µg/ml.

Tomando en conjunto los resultados obtenidos hasta el momento, podemos concluir que nuestro grupo de trabajo ha descubierto una nueva clase de oligonucleótidos inmunoestimulantes en humanos.

El estudio estructural de estos oligonucleótidos nos permitió establecer: i) el motivo responsable de la actividad inmunoestimulante en humanos; ii) la composición nucleotídica óptima del motivo; iii) el tamaño mínimo de la molécula con actividad inmunoestimulante; iv) la posición óptima del motivo y v) la constitución de nucleótidos en los extremos 5' y 3' fuera de los motivos activos.

De esta manera para un ODN de 24 nucleótidos de longitud, su secuencia quedaría constituida de la siguiente manera:

5' N N N N Py N (T/A) (T) (T) (T/G) G T Py N (T/A) (T) (T) (T/G) G T N N N N 3'

Donde: N es una A, T, C o G.

Py es una C o T.

Entre paréntesis, los nucleótidos que más influyen en la actividad inmunoestimulante.

En la siguiente tabla (A12) se representan algunos de los oligonucleótidos que responden a la secuencia, arriba mencionada, con actividad inmunoestimulante en humanos evaluados *in vitro*.

Tabla A12. Oligonucleótidos 5'NNNN PyN(T/A)(T)(T)(T/G)GT PyN(T/A)(T)(T)(T/G)GT NNNN3'.

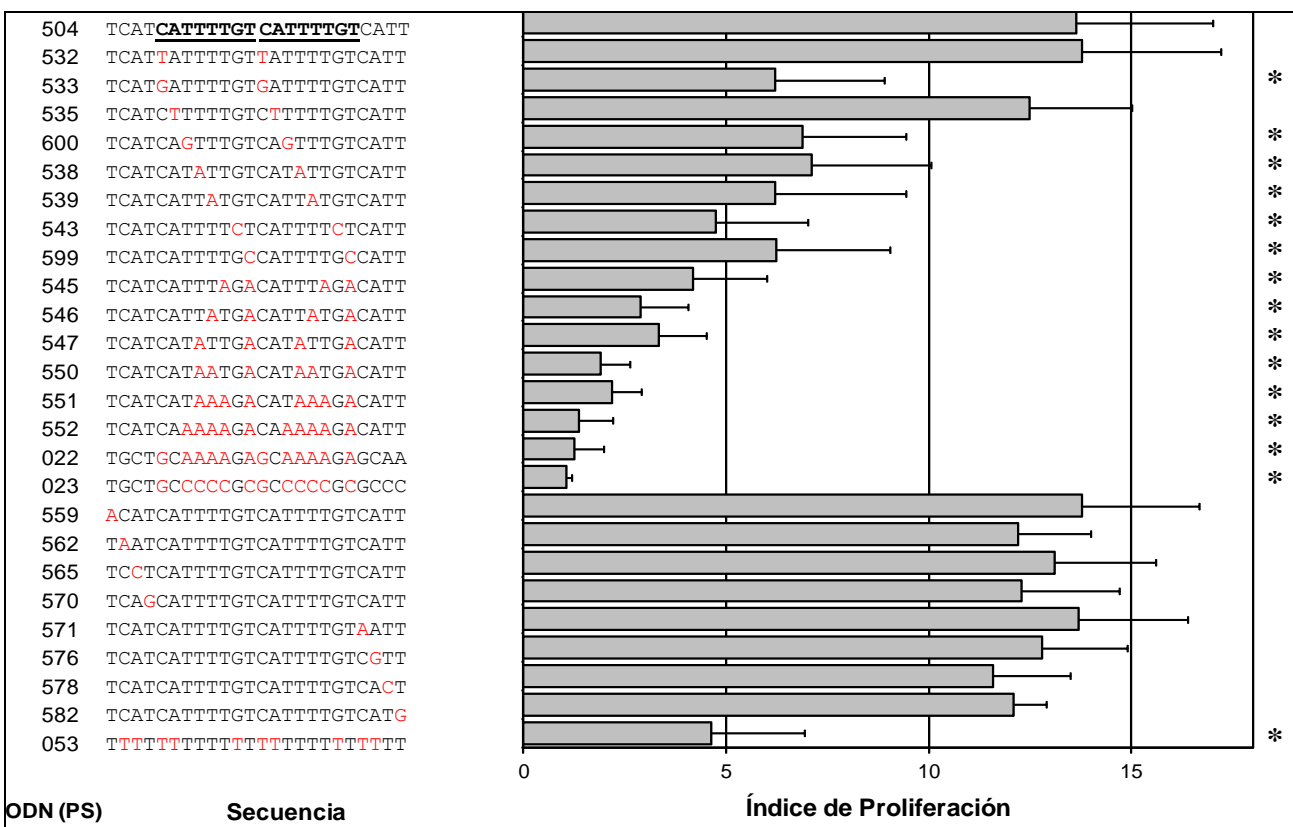
Oligonucleótidos	
ODN (PS)	5'NNNN <u>PyN(T/A)(T)(T)(T/G)GT</u> <u>PyN(T/A)(T)(T)(T/G)GT</u> NNNN3'
ODN 504	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 505	TCCTC <u>C</u> TTTTGTCCTTTTTGTCCTT
ODN 506	TCTT <u>C</u> TTTTGTCCTTTTTGTCCTT
ODN 532	TCATT <u>A</u> TTTTGTTATTTTTGTCATT
ODN 534	TCATC <u>C</u> TTTTGTCCTTTTTGTCATT
ODN 535	TCATC <u>T</u> TTTTGTCCTTTTTGTCATT
ODN 197	TCATTTTTTTGTTTTTTTTGTCATT
ODN 198	TCATTGTTTTGTTGTTTTGTCATT
ODN 199	TCATTCTTTTGTCTTTTTGTCATT
ODN 537	TCATCA <u>A</u> TTTGTC <u>A</u> TTTGTCATT
ODN 596	TCATCA <u>T</u> CTTGTCATCTTGTCATT
ODN 601	TCATCA <u>T</u> GTTGTCATGTTGTCATT
ODN 597	TCATC <u>A</u> TTCTGTCATTCTGTCATT
ODN 602	TCATC <u>A</u> TTGTGTCATTGTGTCATT
ODN 603	TCATC <u>A</u> TTTGGTCATTTGGTCATT
ODN 608	TCATCA <u>A</u> TTGGTCAATTGGTCATT
ODN 559	ACA <u>T</u> CATTTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 560	CCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 561	GCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 562	TAATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 563	TTATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 564	TGATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 565	TCCTC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 566	TCTTC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 567	TCGT <u>C</u> ATTTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 568	TCA <u>A</u> CATTTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 569	TCA <u>C</u> ATTTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 570	TCAG <u>C</u> ATTTTTGTCATTTTTGTCATT
ODN 571	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTAATT
ODN 572	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTTATT
ODN 573	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTGATT
ODN 574	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCCTT
ODN 575	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCCTT
ODN 576	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTCGTT
ODN 577	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTC AAT
ODN 578	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTC A CT
ODN 579	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTC A GT
ODN 580	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTC A TA
ODN 581	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTC A TC
ODN 582	TCATC <u>A</u> TTTTGTCATTTTTGTC A TG

De esta extensa sub-familia de oligonucleótidos  $Py N (T/A)(T)(T)(T/G)GT$ , elegimos un ODN cuyo motivo responde a la secuencia  $PyNTTTTGT$  donde, en este caso particular la  $Py$  es una C y  $N$  es una A. El motivo resultante entonces es CATTTTGT.

El ODN 504 posee dos motivos CATTTTGT y fue el elegido como el oligonucleótido prototipo  $PyNTTTTGT$ , con el objetivo de seguir caracterizando la actividad de estos oligonucleótidos en el sistema inmune.

Debido a que este oligonucleótido sería utilizado en futuros ensayos, se realizaron diferentes cambios al motivo CATTTTGT del ODN 504. En la figura A3, se muestra la variación en el índice de proliferación de CMSP humanas ante el cambio de ciertas bases que alteran uno o ambos motivos (CATTTTGT). El índice de proliferación disminuye en un 40-60% si uno de los nucleótidos críticos es modificado en ambos motivos mientras que si se modifican dos nucleótidos la actividad perdida varía entre el 60-90% dependiendo de la posición específica del nucleótido alterado. Claramente, los cambios fuera del motivo no modifican significativamente la actividad.

**Figura A3. Influencia de los nucleótidos pertenecientes al motivo CATTTTGT (ODN prototipo PyNTTTTGT) en la actividad inmunoestimulante medida a través del índice de proliferación celular.**



En rojo se muestran los cambios introducidos en el ODN 504, el cual posee dos motivos CATTTTGT. Los resultados mostrados corresponden al promedio de 4 replicas realizadas con CMSP humanas de diferentes donantes. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml. ODN's con uniones fosforotioato (PS). El análisis estadístico se realizó aplicando el test *t* de Student. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a la actividad del ODN 504 fueron indicadas con (\*).

### Evaluación de la acción de un oligonucleótido PyNTTTTGT sobre células que participan en el desarrollo de la inmunidad innata y adaptativa.

Otro de los parámetros a evaluar en la caracterización de una molécula inmunoestimulante es la capacidad de estimular a las células presentadoras de antígeno (CPA), dentro de este grupo encontramos a las células dendríticas (CD), macrófagos y linfocitos B, siendo las CD las CPA más eficientes y las únicas capaces de inducir una respuesta inmune primaria a través de la activación de los linfocitos T naive.

Clásicamente se describen a las CD en dos estados de maduración, como células dendríticas inmaduras (CDI) ejerciendo funciones de vigilancia en los tejidos donde, luego de capturar al antígeno lo procesan, y comienza el proceso de maduración y migración de estas células hacia las zonas T (dependientes) del centro germinal donde presentarán el antígeno a los linfocitos T naive. Este proceso de

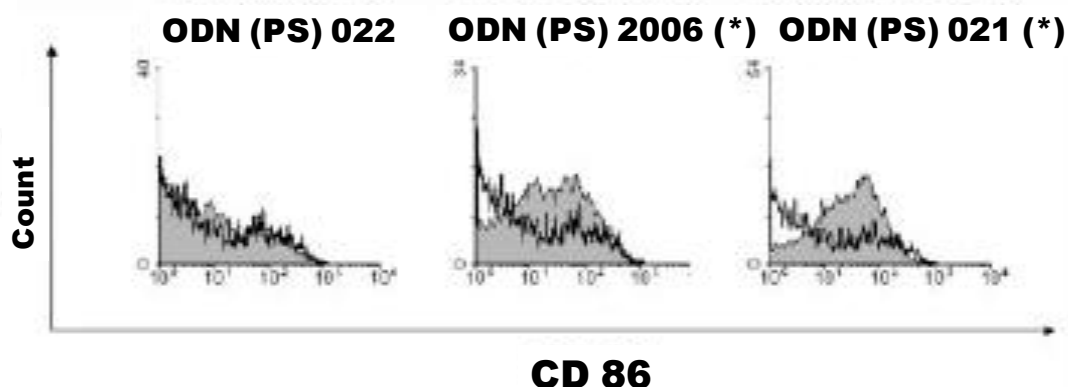


maduración se caracteriza por: 1) la pérdida de la capacidad de capturar antígeno, 2) por el aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80/B7.1, CD86/B7.2, CD40, CD69) y moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y 3) la regulación de la expresión de varios genes que codifican para citoquinas, proteínas inflamatorias y moléculas de adhesión. Al mismo tiempo que se evidencia un aumento de la capacidad de procesar al antígeno.

La maduración de las células dendríticas puede ser producido *in vitro* por acción de productos bacterianos por ejemplo: Lipopolisacárido, ADN bacteriano o ARN viral. Sin embargo, la maduración se completa cuando las CD interactúan con los linfocitos T naive.

Nosotros pudimos comprobar que el ODN 021 era capaz de estimular la expresión de la molécula co-estimuladora CD86 en células mononucleares de sangre periférica humana CD19<sup>+</sup> (linfocitos B), este aumento de expresión fue tan eficiente como el del ODN CpG 2006. Este resultado junto con los ya obtenidos (Ip y secreción de citoquinas), confirma una vez más la existencia de una rama de oligonucleótidos sin motivos CpG con actividad inmunoestimulante en humanos, figura A4. El ODN 022 utilizado como control negativo, no mostró capacidad alguna de aumentar la expresión de CD86 sobre los linfocitos B, lo cual nos permite afirmar que la actividad observada por el ODN 021 es específica.

**Figura A4. Expresión de CD86 en células CD19<sup>+</sup> (linfocitos B).**

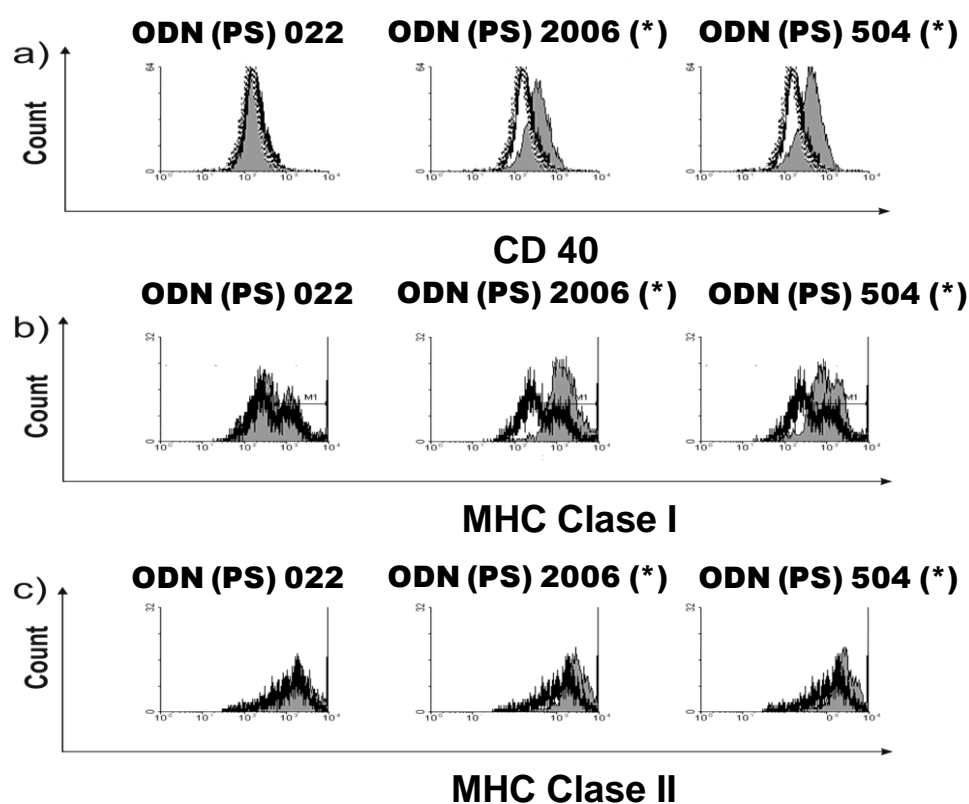


Inducción de la expresión de CD86 en linfocitos B estimuladas con el ODN CpG 2006 o no-CpG 021 y 022. Los ODN's poseen uniones fosforotioato (PS) y fueron utilizados a una concentración de 1,5 µg/ml. Las células Mononucleares Periféricas en sangre humanas fueron cultivadas durante 48 h. con el ODN indicado y luego teñidas con anticuerpos, conjugados a fluorocromos, anti CD19-PE/CD86-FITC. Los resultados de la citometría de flujo son presentados en histogramas correspondientes a las poblaciones positivas (gate +) para CD19. Sin estimular □ o estimuladas con ODN ■. Cada experimento fue repetido 4 veces con CMSP de diferentes donantes. Los resultados fueron similares en todos los casos. El análisis estadístico se realizó aplicando el test *t* de Student. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) fueron indicadas con (\*).

### Evaluación de la expresión de las moléculas CD40, MHC I/II en células CD19<sup>+</sup> estimuladas con ODN conteniendo el motivo *PyNTTTTGT*.

En función del resultado obtenido con el ODN 21, fue de nuestro interés evaluar la expresión de diferentes moléculas co-estimuladoras en linfocitos B de sangre periférica humana estimulados con diferentes oligonucleótidos. En la figura A5 se muestra la expresión de tres diferentes moléculas: CD40, MHC-I y MHC-II en cultivos de CMSP estimulados con el ODN 504 cuyo motivo *PyNTTTTGT* está compuesto por la secuencia *CATTTTGT*, un oligonucleótido CpG (ODN 2006) y un ODN negativo (ODN 022). Los resultados demostraron que el ODN 504 es tan activo como el 2006 en estimular la expresión del CD40, MHC I y II en células CD19<sup>+</sup> humanas.

**Figura A5. Inducción de CD40, MHC-I y MHC-II en células CD19<sup>+</sup> (Linfocitos B) utilizando un prototipo de los ODN's *PyNTTTTGT* con uniones fosforotioato.**



CMSP humanas fueron cultivadas durante 24h con el ODN *PyNTTTTGT* 504, el CpG 2006 (control positivo) y el ODN 022 (control negativo). Luego las células fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD19PE/CD40Fitc (a), anti-CD19PE/MHC-IFitc (b), o anti-CD19PE/MHC-IIIFitc (c). Los ODN's poseen uniones fosforotioato (PS) El análisis de la citometría de flujo mostrado en los histogramas de a, b y c corresponde a las poblaciones CD19<sup>+</sup>. Células sin estimular se indican en □ y las células estimuladas con ODN en ■. En todos los casos existieron diferencias significativas para el ODN 2006 y el 504 con respecto a las células sin estimular (*t* de Student  $p < 0.05$ ). El experimento fue repetido 8 veces con células de diferentes donantes y en todos los casos se observaron resultados similares.

### Determinación de la activación de las células B por ODN's *PyNTTTTGT*.

Hasta el momento hemos observado que el ODN 504 activa a las células B (CD19<sup>+</sup>) provenientes de CMSP humanas. Para determinar si esta activación es directa o indirecta, se estimularon con diferentes ODN's células B puras obtenidas por selección negativa a partir de CMSP y se evaluó: proliferación celular, secreción de IL-6 e IgM y expresión de moléculas co-estimuladoras.

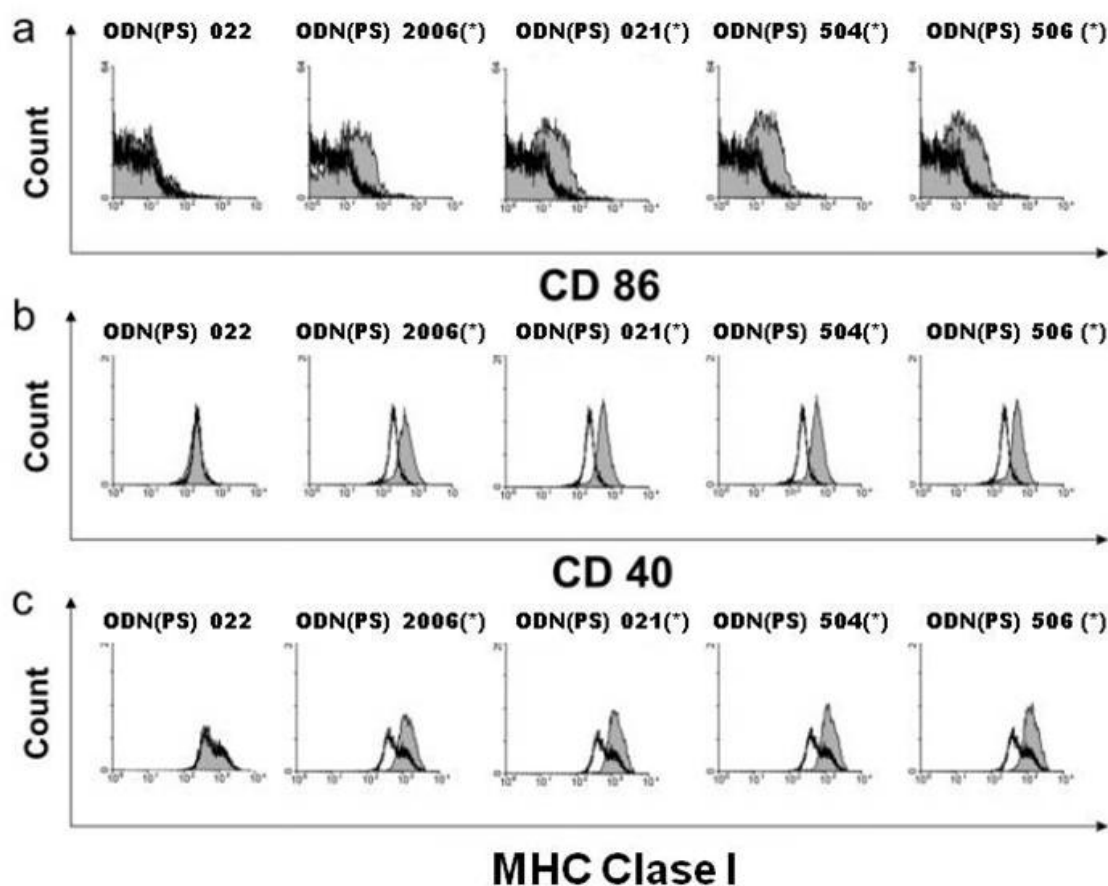
En la tabla A13 y figura A6 se observó que la actividad inmunoestimulante de los ODN's prototipos *PyNTTTTGT* (ODN 504 y 506) en linfocitos B purificados es equivalente a la actividad previamente descrita en CMSP, este resultado demuestra que los ODN's no-CpG actúan directamente sobre linfocitos B. Similares resultados se obtuvieron con células B puras obtenidas por selección positiva (datos no mostrados).

**Tabla A13. Actividad inmunoestimulante de ODN's *PyNTTTTGT* sobre linfocitos B purificados.**

ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación			IL-6 (pg/ml)			IgM (ng/ml)		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
ODN 022	TGCTGCAAAAAGAGCAAAAAGAGCAA	1.54	5	0.62	1019	5	665	451	5	173
ODN 021	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	22.16	5	5.67	9588	5	729	856	5	203
ODN 504	TCATCATTGTCATTGTCATT	46.45	5	7.48	11002	5	884	1216	5	238
ODN 506	TCTTCTTTTGTCTTTTGTCTTT	29.63	5	6.92	10266	5	888	1291	5	327
ODN 2006	TCGTCGTTTGTGCTTTTGTGCTT	50.22	5	7.03	8300	5	907	1255	5	317
Medio (RPMI)	---	1.00	5	----	972	5	544	448	5	156

Los promedios (Prom.) mostrados son el resultado de N ensayos realizados con linfocitos B purificados de CMSP de diferentes donantes. (PS) ODN's fosforotioato. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 0,375 µg/ml para los ensayos de proliferación, 6 µg/ml en la medición de IL-6 y 1,5 µg/ml para IgM.

Figura A 6. Inducción de CD86, CD40 y MHC-I sobre linfocitos B purificados y estimulados con ODN's *PyNTTTTGT*.



Linfocitos B humanos purificados fueron cultivados durante 24 h con ODN's *PyNTTTTGT* fosforotioato (PS) indicado o controles (ODN CpG 2006 y ODN 022), luego teñidos con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD19PE/anti-CD40Fite (a), anti-CD19PE/anti-MHC-IFite (b) o anti-CD19-PE/anti-MHC-II-Fite (c). Las células sin estimular se indican en □ y las estimuladas con ODN con ■. En todos los casos existieron diferencias significativas (\*) entre los ODN's *PyNTTTTGT* con respecto a las células sin estimular ( $t$  de Studen  $p < 0.05$ ). El experimento fue repetido 4 veces con células de diferentes donantes y en todos los casos se observaron resultados similares.

Hasta aquí nuestro grupo de trabajo ha demostrado que oligonucleótidos de la serie *PyNTTTTGT* estimulan directamente a linfocitos B.

Como mencionamos anteriormente, una de las principales características para que un oligonucleótido actúe como adyuvante reside en su capacidad de poder estimular a las células dendríticas (CD).

Las CD son las células presentadoras de antígenos más eficientes y las únicas capaces de inducir una respuesta inmune primaria. En general cuando hablamos de las CD nos referimos a las CD mieloides

(mCD) las cuales poseen los marcadores CD11c+ y CD123low. La segunda población de CD son las CD plasmacitoides (pDC) que a la inversa de las mDC expresan el fenotipo CD11c- y CD123high.

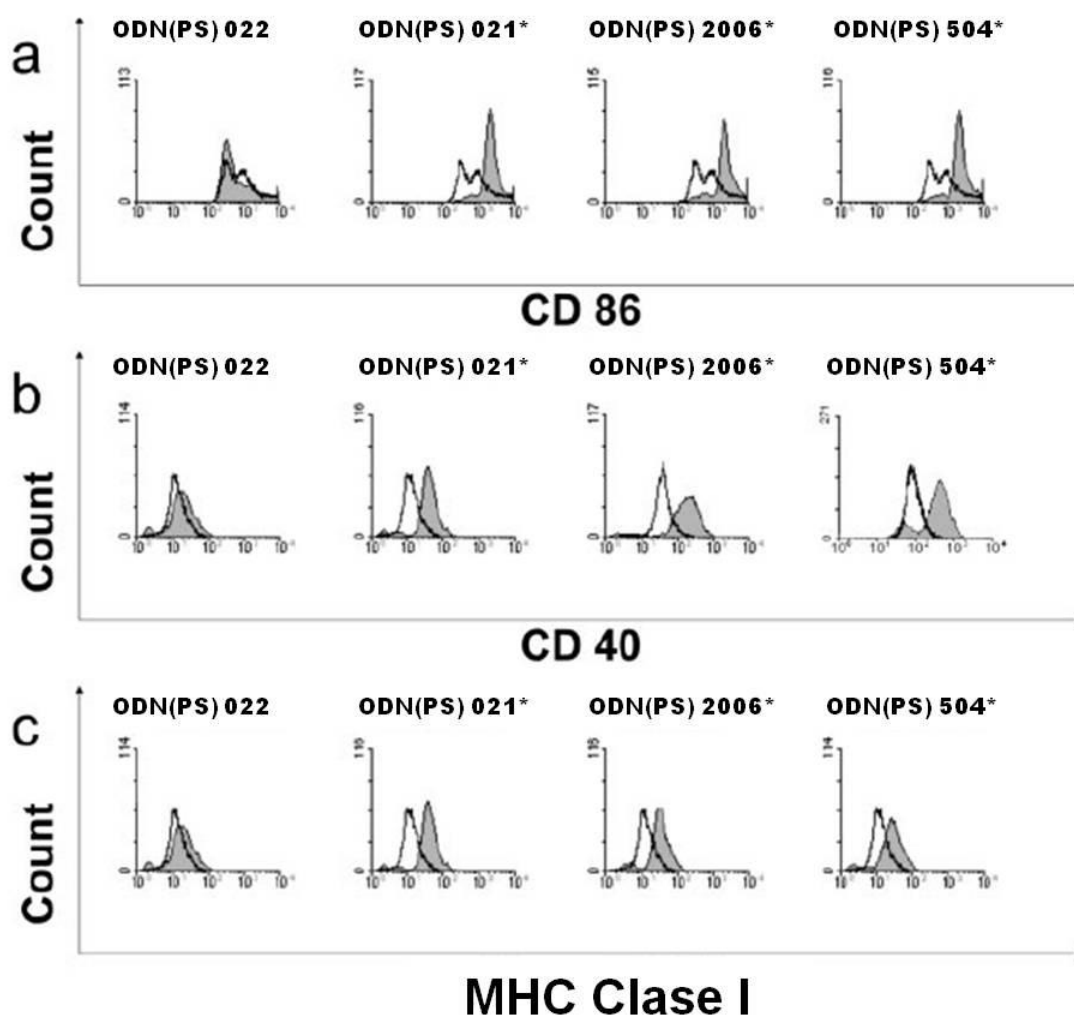
En función de la actividad inmunoestimulante observada por los ODN's *PyNTTTTGT* en CMSP y células B humanas, resultó interesante identificar si las células dendríticas (CD) también son activadas por estos oligonucleótidos.

#### **Estimulación directa de células dendríticas plasmacitoides (pDC) por ODN's *PyNTTTTGT*.**

Las células dendríticas plasmacitoides fueron purificadas a partir de CMSP por selección positiva y estimuladas con diferentes oligodeoxinucleótidos.

En la figura A7, se observa que el ODN 504 el cual contiene dos motivos optimizados *PyNTTTTGT* y el ODN 21 con dos motivos sin optimizar, son capaces de estimular moléculas co-estimuladoras sobre pDC purificadas al igual que el ODN CpG 2006.

Figura A7: Inducción de CD86, CD40 y MHC-I en pDC estimuladas con ODN's.



Celulas dendriticas plasmacitoides (pDC) humanas fueron purificadas y cultivadas durante 24 h con el ODN 504, controles (CpG 2006 o 022) y el ODN no CpG 21. Uniones fosfotioato (PS). Las células fueron teñidas con anticuerpos, conjugados a fluorocromos, anti-CD4-PE, anti-CD11c-Cy/anti-CD86-Fitc (a); anti-CD4-PE, anti-CD11c-APC /anti-CD40-Fitc (b); anti-CD4-PE, anti-CD11c- C $\gamma$  /anti-MHC-I-Fitc(c). Los resultados del análisis por citometria de flujo son mostrados en histogramas correspondientes al gate + para CD4 y – para CD11c. Las células sin estimular se indican en  $\square$  y las estimuladas con ODN con  $\blacksquare$ . En todos los casos existieron diferencias significativas (\*) entre los ODN's *PyNTTTTGT* con respecto a las células sin estimular ( $t$  de Studen  $p < 0.05$ ). El experimento fue repetido 4 veces con células de diferentes donantes y en todos los casos se observaron resultados similares.

Este aumento en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD86 como así también del MCH-I en las pDC, producto de la activación por los ODN's *PyNTTTTGT*, confiere a estas células la capacidad de activar a las células T naive.

Cabe destacar que cuando evaluamos la actividad de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* en CD puras de la línea mieloide, no observamos actividad de ninguno de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT*

testeados en cuanto al aumento de expresión de las diferentes moléculas co-estimuladoras y MHC, como tampoco observamos actividad en estas células por el ODN CpG 2006 (datos no mostrados).

Una de las características más sobresalientes de las pDCs es la capacidad de secretar grandes cantidades de IFN tipo I, por lo tanto luego de establecer la actividad de los ODN's *PyNTTTTGT* el siguiente objetivo fue determinar la presencia de IFN- $\alpha$  en sobrenadantes de cultivo estimulados con diferentes oligonucleótidos.

### Los ODN's *PyNTTTTGT* no inducen la secreción de IFN- $\alpha$ .

Entre los diferentes oligonucleótidos testeados incluimos a un ODN CpG clase A (también llamado tipo D), cuyo prototipo es el ODN 2216. Esta clase de oligonucleótidos funcionan como potentes inductores de la secreción de IFN  $\alpha/\beta$  por parte de las pDC y no son efectivos en activar a las células B.

En cuanto a su estructura, los ODN's CpG clase A poseen una región central fosfodiéster, palindrómica la cual contiene uno o más pares CpG, mientras que en los extremos 5' y 3' tienen polyG (de 3 a 6 bases G consecutivas) con uniones fosfotioato. En la siguiente tabla podemos observar que sólo los ODN CpG son capaces de estimular la secreción de IFN $\alpha$  en pDC purificadas por selección positiva.

**Tabla A14. Evaluación de la secreción de IFN- $\alpha$  en Células Dendríticas Plasmacitoides.**

ODN (PS)/(Mix)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	IFN $\alpha$ pg/mL		
		Prom.	N	SD
ODN 2006 (PS)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	747	8	294
ODN 021 (PS)	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	<62.5	8	n/a
ODN 022(PS)	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	<62.5	7	n/a
ODN 504 (PS)	TCATCATTTTGTCAATTTTGCATT	<62.5	8	n/a
ODN 506(PS)	TCTICTTTTTGTCTTTTTGTCTTT	<62.5	6	n/a
ODN 518 (PS)	TCGTCGAAAAGTCGAAAAGTCGAA	6950	9	2354
ODN 2216 (Mix)	G*G*GGGACGATCGCGG*G*G*G*G	14079	9	3448
Medio (RPMI)	---	<62.5	9	----

Células dendríticas plasmacitoides (pDC) humanas fueron purificadas y cultivadas durante 48 h con ODN's *PyNTTTTGT*, ODN CpG 2006 y control negativo ODN22 (PS, uniones fosfotioato). El ODN 2216 es un ODN Mix, los asteriscos indican uniones fosfodiéster (PO). Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN's de 6  $\mu$ g/ml.

El ODN 2006 pertenece a los ODN CpG clase B (también llamado tipo K). En cuanto a su estructura, esta clase de ODN's poseen únicamente enlaces fosfotioato y múltiples motivos CpG, son lineales y no forman estructuras de orden superior, como lo hacen los de tipo A. Se caracterizan por ser potentes estimuladores de las células B, generando que proliferen, expresen moléculas co-estimuladoras

(como MHC clase II, CD80, CD86, CD40) y secreten citoquinas, como IL-6, e inmunoglobulinas. La actividad que ejercen sobre las células las pDC se encuentra limitada a aumentar su supervivencia e inducir su maduración. Sin embargo, generan una leve y transitoria secreción de IFN tipo I.

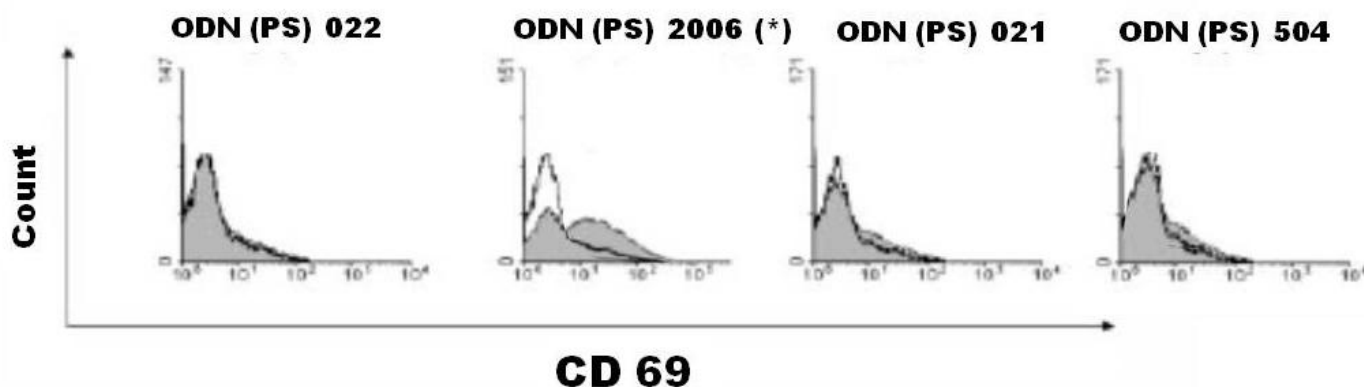
Nuestros resultados reflejan claramente por un lado, la activación diferencial en la secreción de IFN $\alpha$  por parte de los ODN CpG clase A y B y por otro, que los ODN's *PyNTTTTGT* no inducen la secreción de IFN $\alpha$ .

### Solo oligonucleótidos con motivos CpG son capaces de estimular a las células NK/NKT.

Cuando evaluamos la capacidad de diferentes ODN's en activar a las células Natural Killer/ Natural Killer T (NK/NKT) en CMSP, observamos que solo el ODN CpG 2006 fue capaz de estimular la expresión del antígeno temprano (CD69) en células CD56<sup>+</sup> de manera significativa.

Los oligonucleótidos 021 y 504 estimularon muy levemente a las células NK/NKT.

**Figura A 8. Expresión de CD69 en células CD56<sup>+</sup> estimuladas con el ODN CpG 2006 y ODN's no-CpG**



CMSP humanas fueron cultivadas durante 24hs con los oligonucleótidos 504, 021, CpG 2006 y 022 (ODN negativo). Las células fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD56PE/CD69Fitc. El análisis de la citometría de flujo mostrado en los histogramas corresponde a las poblaciones CD56<sup>+</sup>. Células sin estimular se indican en □ y las células estimuladas con ODN en ■. Sólo el ODN 2006 presentó diferencia significativa con respecto al células sin estimular (*t* de Studen  $p < 0.05$ ) indicada con (\*). Uniones fosfotioato (PS). El experimento fue repetido 6 veces con células de diferentes donantes y en todos los casos se observaron resultados similares.

Los oligonucleótidos de la serie *PyNTTTTGT* comparten diferentes actividades con los ODN's CpG. Sin embargo, no son capaces de estimular la expresión del CD69 en células NK/NKT y promover la secreción de IFN- $\alpha$  como si lo hacen ODN CpG. En consecuencia, analizamos detenidamente la secuencia del ODN CpG 2006 con el objetivo de establecer una correlación entre su estructura y su actividad.



Así fue como pudimos observar que este ODN CpG además de poseer cuatro dinucleótidos CG, posee dos motivos consecutivos *PyNTTTTGT* representados por la siguiente secuencia de nucleótidos CGTTTTGT.

ODN CpG 2006: TCGTCGTTTTGT CGTTTTGTCGTT.

La existencia de estos dos motivos en el ODN CpG2006 dificultaba el poder discriminar si el efecto observado en las células era debido al motivo CpG o al motivo *PyNTTTTGT* el cual contiene dinucleótidos CG. Por lo tanto, diseñamos una serie de oligonucleótidos y evaluamos la actividad en células B y/o NK/NKT. En la tabla A15, se puede observar que el ODN CpG 2006 y el ODN 518 al cual se sustituyeron las cuatro T's consecutivas del motivo *PyNTTTTGT* son activos en ambos tipos celulares, células B y NK/NKT, recordemos que cuando esta misma modificación se realizó al ODN 504 originando el ODN 552 (figura A3) no se observó actividad inmunoestimulante. El ODN 519 además de poseer las sustituciones de las cuatro T's del motivo, contiene el reemplazo de las T por A de los trinucleótidos TCG, estos cambios resultaron en la pérdida de todas las actividades inmunoestimulantes ensayadas. Sin embargo, cuando se restituyen las T's del motivo *PyNTTTTGT* (ODN 517) se recupera la actividad en las células B.

Estos resultados estarían indicando que la presencia del motivo *PyNTTTTGT* es responsable de la actividad en células B, y los trinucleótidos TCG son los responsables de ejercer la actividad en ambos tipos celulares, células B y NK/NKT.

Con el objetivo de discriminar cual o cuales de los cuatro dinucleótidos CG son los responsables de la actividad inmunoestimulante observada, se realizaron inversiones de cada uno de estos pares en el ODN CpG 2006; originando los oligonucleótidos 587, 586, 585 y 584; tabla A15. Los resultados demostraron principalmente que los dos TCG sucesivos en el extremo 5' del ODN CpG 2006 son los responsables de la actividad descrita en células B (índice de proliferación) y en células NK/NKT (CD69<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>).

Tabla A15. Estimulación en células B y NK/NKT por ODN's derivados del ODN CpG 2006.

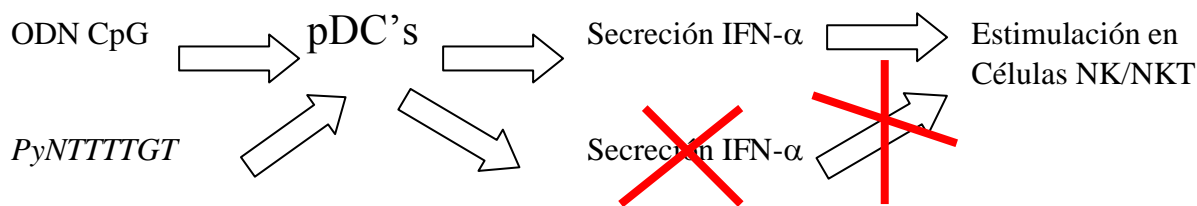
ODN (PS)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Estimulación B (índice de proliferación)	Estimulación NK/NKT (células CD56 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup> )
ODN 2006	<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	+	+
ODN 518	TCGTCG <b>AAAA</b> GTCG <b>AAAA</b> GTCGAA	+	+
ODN 519	<b>ACG</b> ACG <b>AAAA</b> G <b>ACG</b> <b>AAAA</b> G <b>ACG</b> AA	-	-
ODN 517	ACGACGTTTTGACGTTTTGACGTT	+	-
ODN 587	<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	+	+
ODN 586	<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	+	±
ODN 585	<u>TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	+	-
ODN 584	<u>TGCTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT</u>	+	-
ODN 022	TGCTGCAAAGAGCAAAGAGCAA	-	-

Se realizaron cuatro experimentos independientes en CMSP provenientes de diferentes donantes. Cada ensayo se realizó por cuadruplicado. Los cambios con respecto al ODN 2006 están subrayadas o en color. Un índice de proliferación de 4 o más fue considerado positivo para estimulación de las células B. El índice de proliferación para ODN's negativos fue considerado < a 2 (-). Uniones fosforiladas (PS). Una intensidad promedio de fluorescencia del 60% o más con respecto al ODN 2006 fue considerada como positivo (+) para la estimulación de células NK. La intensidad de fluorescencia media porcentual de ODN 586 fue del 40% con respecto al ODN 2006 y fue considerada como (±). La intensidad promedio de fluorescencia para ODN's negativos fue del 10% con respecto al ODN 2006. Las diferencias entre ODN's positivos y negativos fueron estadísticamente significativas (p < 0,01) por la prueba t de Student

Este análisis nos permitió determinar que el ODN CpG 2006 posee dos motivos independientes: el motivo *PyNTTTTGT* (aquí descrito) el cual se encuentra relacionado con la capacidad de estimular directamente a las células humanas B y pDC y, además 2 (dos) *TCG* sucesivos en el extremo 5' (ODN 518), los cuales son los responsables de estimular tanto a las células B como a las células NK/NKT (para producir INF- $\alpha$ ).

El ODN518 produce más INF- $\alpha$  que el ODN 2006 (tabla A 14). En ese momento pensamos que el motivo *PyNTTTTGT* contenido en el ODN2006 podría estar inhibiendo la inducción de esta citoquina por parte de los motivos *TCG*, lo cual demostramos en nuestro laboratorio posteriormente.

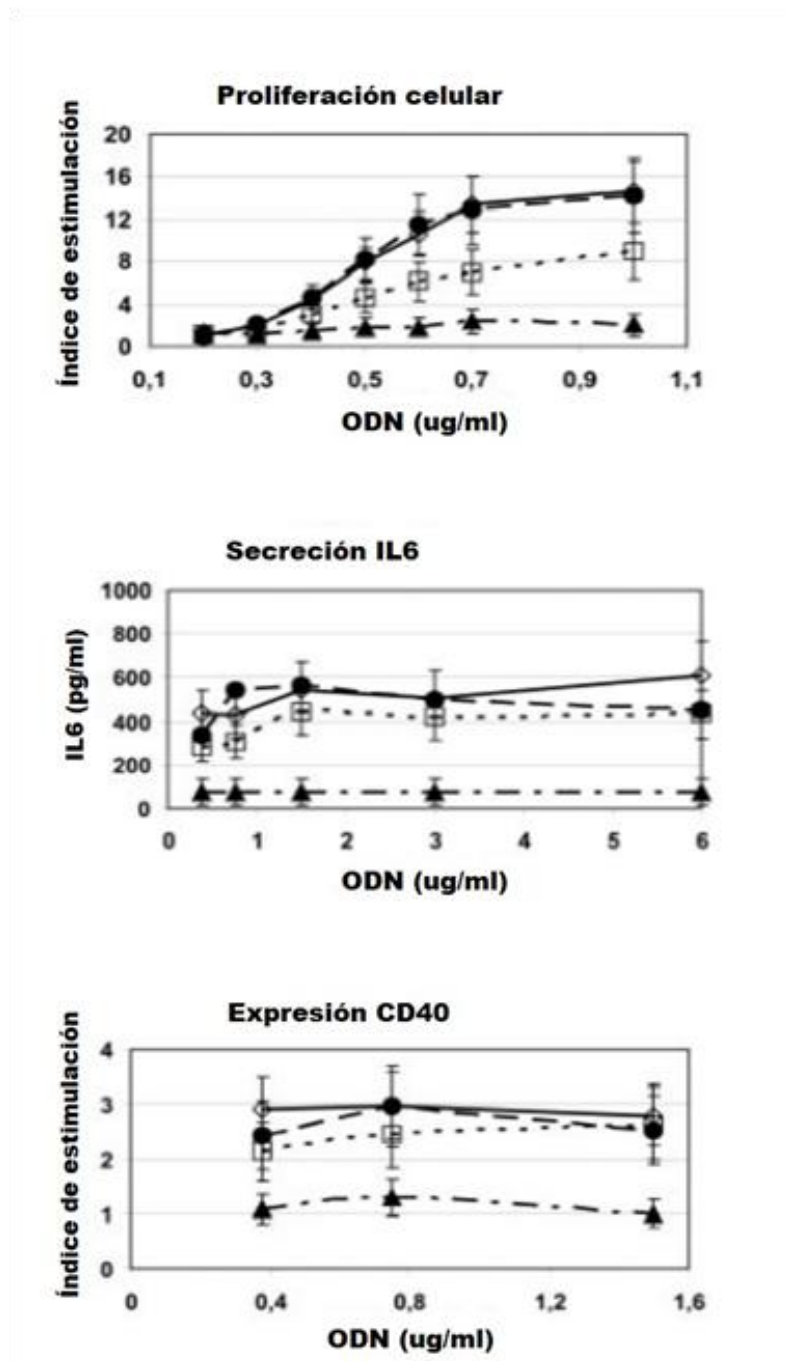
Los únicos oligonucleótidos capaces de estimular a las pDC en secretar INF- $\alpha$  fueron los ODN's CpG. Nosotros pensamos que la carencia de actividad de los ODN's *PyNTTTTGT* en las células NK/NKT se debe a la falta de inducción en la secreción de INF-  $\alpha$ , como se representa en el siguiente esquema. Futuros ensayos, sobre las poblaciones NK/NKT puras, son necesarios para confirmar lo anteriormente expuesto.



Los resultados obtenidos anteriormente en los ensayos de proliferación, medición de la estimulación de la secreción de IL-6 y expresión de CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> demostraron que el ODN 504 prototipo *PyNTTTTGT* al menos cualitativamente, es muy similar al ODN CpG 2006. En estos ensayos ambas clases de oligonucleótidos estimularon a los mismos tipos celulares, diferenciándose en la capacidad de inducir la síntesis de IFN- $\alpha$  y en estimular a las células NK/NKT.

Con el objetivo de investigar si el ODN 504 se comporta cuantitativamente similar al ODN CpG 2006, se realizaron diferentes ensayos dosis-respuesta.

Como se observa en la figura A9, las curvas correspondientes al ODN 504 y al ODN CpG2006 son similares en las tres actividades ensayadas: proliferación celular, secreción IL-6 y expresión de la molécula CD40. Sin embargo, el ODN 21 el cual como mencionamos anteriormente el motivo *PyNTTTTGT* es defectivo en un nucleótido, presenta menor actividad a bajas concentraciones con respecto a los ODN CpG 2006 y al ODN 504.

Figura A9. Curvas dosis-respuesta de ODN's CpG y ODN no CpG *PyNTTTTGT*.

Comparación de los ODN's 504, ODN21, CpG 2006 basados en la dosis respuesta del índice de proliferación de CMSP estimuladas con diferentes concentraciones de ODN's (PS). ODN 504 (◇), ODN 21 (□), ODN 22 (■) y ODN 2006 (●). Se utilizó el ODN22 como control negativo. ODN con uniones internucleótidos fosforioato (PS) a diferentes concentraciones. Cada experimento fue repetido cuatro veces utilizando CMSP de diferentes donantes. Las curvas representan el promedio  $\pm$  el desvío estándar.

Este análisis nos permitió determinar que prácticamente no existen diferencias cuantitativas entre los ODN's inmunoestimulantes, *PyNTTTTGT* y los ODNCpG con respecto a las actividades ensayadas.

**ODN's *PyNTTTTGT* con uniones fosfodiéster (PO), estimulan linfocitos B.**

Todos los experimentos llevados a cabo para evaluar los efectos inmunoestimulantes *in vitro* de los diferentes ODN's, se realizaron con oligodeoxinucleótidos cuyas uniones internucleótidos eran de fosforotioato (PS). Con el ánimo de dilucidar si la misma secuencia de nucleótidos, pero con uniones fosfodiéster (PO) posee actividad inmunoestimulante, se testaron oligonucleótidos CpG y no CpG PS y PO. Estos experimentos nos resultaron de particular interés, ya que si el ODN504 simula una molécula DAMP, su forma natural posee uniones fosfodiéster.

En la tabla A16 y figura A10 se observa que los ODN's *PyNTTTTGT* PO al igual que los ODN PS desarrollan su actividad inmunoestimulante en CMSP humanas. Sin embargo, es necesario utilizar una mayor concentración de ODN's PO para alcanzar la magnitud de activación que presentan los ODN's PS. Este resultado es esperable, debido a que los oligonucleótidos con esqueleto fosfodiéster son rápidamente degradados, en consecuencia 3 pulsos (de 3µg c/u) de cada uno de los ODN's PO fueron necesarios para alcanzar la actividad descrita. EL ODN 2080 es un oligonucleótido CpG con todas sus uniones PO el cual se utilizó como control positivo (TCGTCGTTCCCCCCCCCCCC).

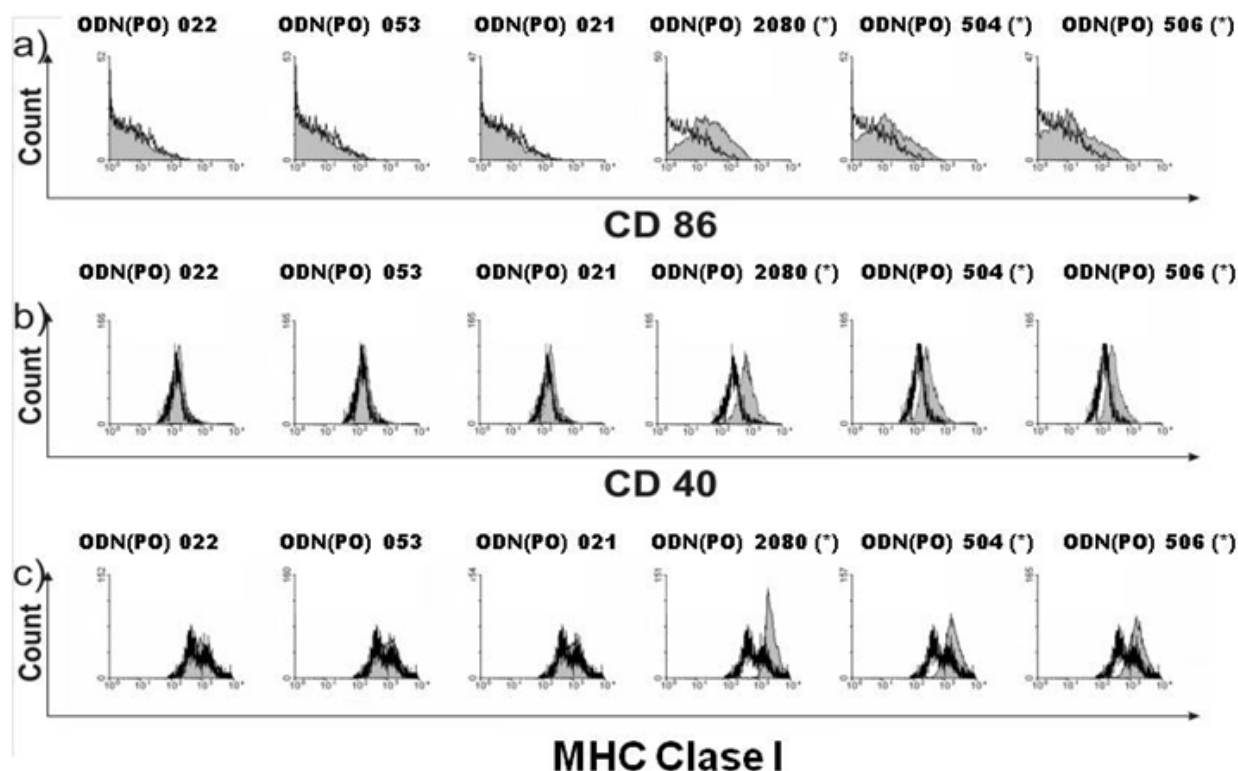
Los ODN's 53 y 21 en sus versiones PO, poseen muy baja actividad inmunoestimulante comparada con sus respectivas versiones PS. Esto indicaría que para oligonucleótidos con uniones PO una fórmula canónica *PyNTTTTGT* es estrictamente requerida y, cuando la versión es más relajada como es el caso de estos oligonucleótidos, es necesario que las uniones internucleótidos sean del tipo PS para presentar la máxima actividad inmunoestimulante. En este contexto, este resultado es de esperar debido a que, a bajas dosis los ODN PS también requieren en su secuencia la fórmula canónica estricta. Por lo tanto, podemos pensar que ODN's en sus versiones PO presentan un efecto de bajas dosis, debido a su degradación.

**Tabla A16. Inducción de la secreción de IL-6 por ODN's PyNTTTTGT con uniones fosforioato o fosfodiéster.**

ODN (PS)/(PO)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	IL-6 (pg/ml)		
		Prom.	N	SD
ODN 022 (PS)	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	38	4	17
ODN 022 (PO)	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	27	4	12
ODN 053 (PS)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	123	4	21
ODN 053 (PO)	TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT	24	4	24
ODN 021 (PS)	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	182	4	51
ODN 021 (PO)	TGCTGCTTTTGTGCTTTTGTGCTT	35	4	12
ODN 504 (PS)	TCATCATTTTGTGCTTTTGTGCTT	285	4	39
ODN 504 (PO)	TCATCATTTTGTGCTTTTGTGCTT	210	4	43
ODN 506 (PS)	TCTTCTTTTGTGCTTTTGTGCTTT	228	4	70
ODN 506 (PO)	TCTTCTTTTGTGCTTTTGTGCTTT	250	4	32
ODN 2006 (PS)	TCGTCGTTTGTGCTTTTGTGCTT	216	4	84
ODN 2006 (PO)	TCGTCGTTTGTGCTTTTGTGCTT	228	4	40
Medio (RPMI)	-----	28	4	14

El promedio (Prom.) fue calculado a partir de N ensayos en CMSP provenientes de diferentes donantes. ODN's con uniones fosforioato (PS) o fosfodiéster (PO). El desvío estándar (SD). Las células fueron estimuladas con 6µg/mL para los ODN's (PS) y en el caso de los ODN's (PO) se utilizó una concentración 30µg/mL en 3 tiempos: 0 y 4/16 hs.

**Figura A10: Inducción de CD86, CD40 y MHC-I en linfocitos B estimulados con ODN's *PyNTTTTGT* (PO).**



CMSP humanas fueron cultivadas 48 hs y estimuladas con el ODN *PyNTTTTGT* indicado, ODN CpG2080 como control positivo y el ODN 022 como control negativo. Finalizado este tiempo las células fueron teñidas con anticuerpos, conjugados a fluorocromos, anti-CD19-PE/anti-CD86-Fitc (a), anti-CD19-PE/anti-CD40-Fitc (b) o anti-CD19-PE/anti-MHC-I-Fitc (c). Uniones internucleótidos fosfodiéster (PO). Las células sin estimular se indican en □ y las estimuladas con ODN con ■. El análisis de la citometría de flujo mostrado en los histogramas de a, b y c corresponde al gate de células CD19<sup>+</sup>. El experimento fue repetido 4 veces con células de diferentes donantes y en todos los casos se observaron resultados similares. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a las células sin estimular fueron indicadas con (\*) por la prueba t de Student.

En resumen, oligodeoxinucleótidos cuyo motivo *PyNTTTTGT* no sea estricto, como es el caso del ODN 53 y el ODN 21, deben poseer sus uniones internucleótidos de fosfotioato (PS) para alcanzar una respuesta similar a las encontradas por los ODN CpG 2006 o el ODN 504. Es decir, los ODN's PS en altas dosis, podrían no requerir la fórmula canónica estricta, mientras que los ODN's PO sí la requieren. Como ya se ha mencionado, posiblemente debido a que la concentración disponible de los oligonucleótidos PO es baja, producto de su degradación.

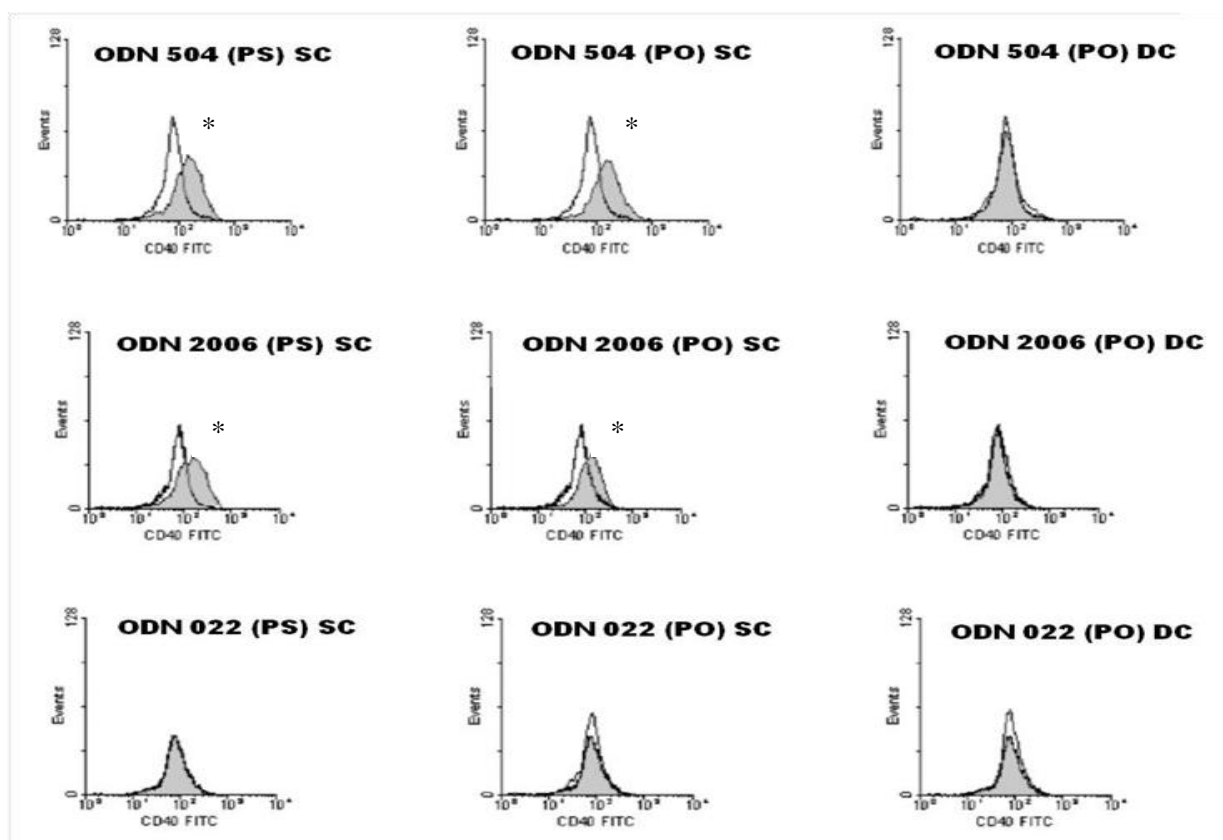
Hasta aquí, el análisis de la actividad inmunoestimulante de los diferentes oligonucleótidos fue testeada en sus versiones PS o PO, pero siempre simple cadena. Con el objetivo de testear si

oligonucleótidos doble cadena aún conservan la actividad inmunoestimulante descrita hasta el momento, se sintetizaron oligonucleótidos CpG o *PyNTTTTGT* simple cadena complementarios.

Los ODN doble cadena se generaron a partir de ODN's PO debido a que la generación de ODN's DS con uniones PS es dificultosa.

En figura A11 se muestra la expresión CD40 en células B (CD19<sup>+</sup>) estimuladas por un ODN CpG prototipo, el ODN 2006, un ODN *PyNTTTTGT* prototipo, el ODN 504 y el ODN 22 como control negativo. Ambos oligonucleótidos, CpG o no CpG, mostraron tener actividad inmunoestimulante solamente como simple cadena (SC), en sus versiones como doble cadenas ninguno de estos oligonucleótidos demostró tener actividad.

**Figura A11. Expresión de CD40 en células B CD19<sup>+</sup> con ODN's CpG y *PyNTTTTGT* simple cadena (SC) y doble cadena (DC).**



CMSP humanas fueron cultivadas 48 hs y estimuladas con oligonucleótidos con uniones fosfodiéster (PO) o fosfotioato (PS); simple cadena (SC) o doble cadena (DC), ODN's CpG 2006 y control ODN 022. Luego las células fueron teñidas con los anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD19-PE/anti-CD40-Fitc. Las células sin estimular se indican en □ y las estimuladas con ODN con ■. El análisis de la citometría de flujo mostrado en los histogramas corresponde al gate de células CD19<sup>+</sup>. El experimento fue repetido 4 veces con células de diferentes donantes y en todos los casos se observaron resultados similares. Las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) con respecto a las células sin estimular fueron indicadas con (\*) por la prueba t de Student.



Los próximos estudios estuvieron orientados a caracterizar la actividad *in vivo* y las posibles aplicaciones de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT*. Para ello, fue necesario encontrar primero un modelo animal en el cual estos oligonucleótidos presenten actividad. Por lo tanto, una de las primeras tareas fue determinar en que especie animal los ODN's *PyNTTTTGT* poseen actividad.

## Capítulo B.

### Evaluación del ODN 504 *in vitro* en diferentes especies animales.

Una de las primeras especies en las cuales se evaluó la actividad inmunoestimulante de un ODN no CpG *PyNTTTTGT* fue en ratón debido a la facilidad de trabajar con estos animales. En ratón el motivo CpG activo está determinado por la secuencia GACGTT y el ODN CpG ampliamente testado *in vitro* e *in vivo* en estos animales es el ODN 1826 PS, por lo tanto utilizamos este ODN como control positivo (61).

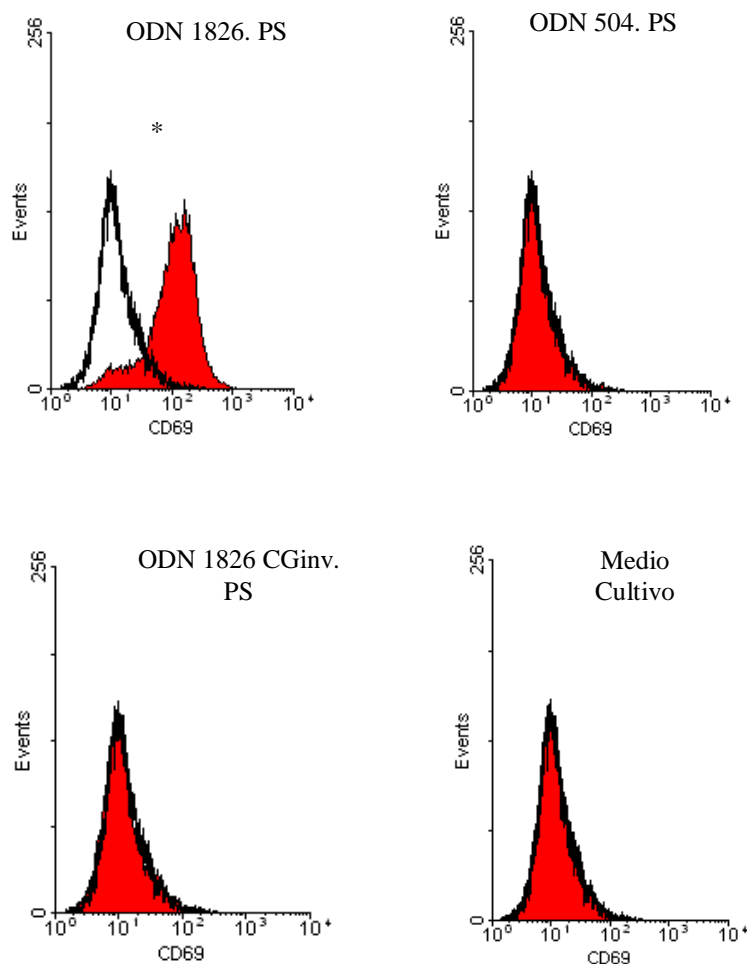
Cuando evaluamos las diferentes actividades inmunoestimulantes en ratones de la cepa Balb/c y CF-1, descubrimos que los únicos oligonucleótidos que presentaban actividad en esta especie animal debían contener motivos CpG en su secuencia. El ODN 1826 con todos los grupos CpG invertidos no mostró actividad (1826 CG inv), tabla B1 y figura B1.

**Tabla B1: Evaluación de la actividad inmunoestimulante del ODN 504 *in vitro* en ratón.**

ODN (S)	Secuencia ( 5' ---> 3' )	Índice de Proliferación			IL-6 pg/mL		
		Prom.	N	SD	Prom.	N	SD
1826	TCCATGACGTTTCCTGACGTT	54,25	7	5,76	25000	10	123
504	TCATCATTTTGTTCATTTTGTTCATT	1,34	7	6,73	132	8	37
1826 CG inv	TCCATG A GCTTCCT GAGCTT	1,22	8	4,81	128	8	42
Medio de Cvo.		1	8	3,59	113	7	23

El promedio mostrado proviene de N ensayos realizados con esplenocitos proveniente de animales diferentes de la cepa Balb/c. El índice de proliferación fue calculado por cuadruplicado. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 6µg/ml.

**Figura B1.** Expresión del antígeno temprano de activación (CD69) en células B (CD19<sup>+</sup>) de ratón.



Esplenocitos provenientes de ratones de la cepa Balb/c fueron cultivados 24hs y estimulados con los ODN CpG 1826 PS; ODN 504 o el ODN Control 1826 CG inv. PS en una concentración de 1.5 $\mu$ g/mL, luego teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD19-PE/anti-CD69-Fitc. Las células sin estimular se indican en  $\square$  y las estimuladas con ODN con  $\blacksquare$ . El análisis de la citometría de flujo mostrado en los histogramas corresponde al gate de células CD19<sup>+</sup>. El experimento fue repetido 5 veces con células de diferentes animales y en todos los casos se observaron resultados similares. La diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) con respecto a células sin estimular fue indicada con (\*) por la prueba t de Student.

A diferencia de la actividad que presentan los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* en humanos, en ratón esta clase de oligonucleótidos no mostró actividad inmunoestimulante. Sin embargo, podría ser posible que los marcadores inmunológicos testeados, no fueran representativos de la acción inmunoestimulante de los ODN's *PyNTTTTGT* *in vitro*. Por lo tanto, evaluamos *in vivo* la acción del ODN 504 junto al antígeno recombinante de Hepatitis B, HBsAg.

### Evaluación de la actividad del ODN 504 *in vivo* en ratones de la cepa Balb/c.

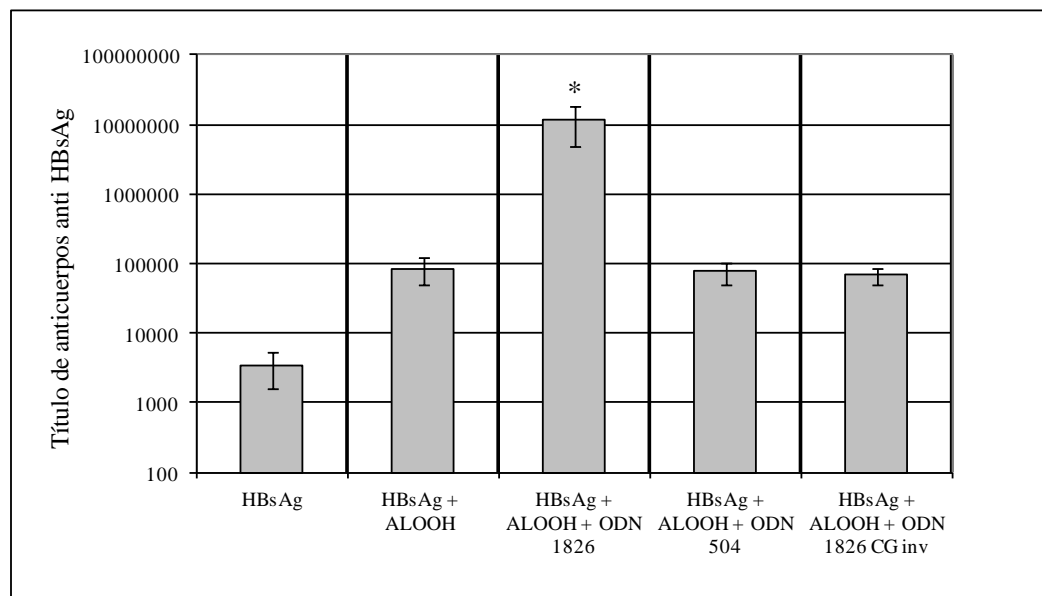
Para evaluar la actividad del ODN 504 se llevó a cabo el siguiente protocolo experimental. Se inmunizaron 5 (cinco) grupo de ratones de la cepa Balb/c de 6-8 semanas de edad con 1µg de antígeno de HBsAg solo o en presencia del 20% v/v de alúmina (ALOOH). Además, a las formulaciones que contenían ALOOH se les agregó 20µg por dosis de cada uno de los ODN's testeados.

El ODN *PyNTTTTGT* prototipo evaluado *in vivo* fue el ODN 504. Se utilizó como control positivo el ODN 1826 y como control negativo el 1826 con todos sus pares CG invertidos (1826 CGinv).

El esquema de inmunización consistió en la inoculación de una única dosis por vía intramuscular en el cuadriceps de la pata trasera izquierda. A los 30 (treinta) días post-inoculación (dpi) se obtuvieron muestras de sangre a las cuales se les separó el suero, y se determinó el título de anticuerpos específicos anti HBsAg mediante la técnica de ELISA desarrollada en nuestro laboratorio.

En la siguiente figura B2 se representan los promedios de los títulos de IgG Total específica de todos los grupos experimentales.

**Figura B2.** Evaluación *in vivo* de la actividad del ODN 504 en ratón.



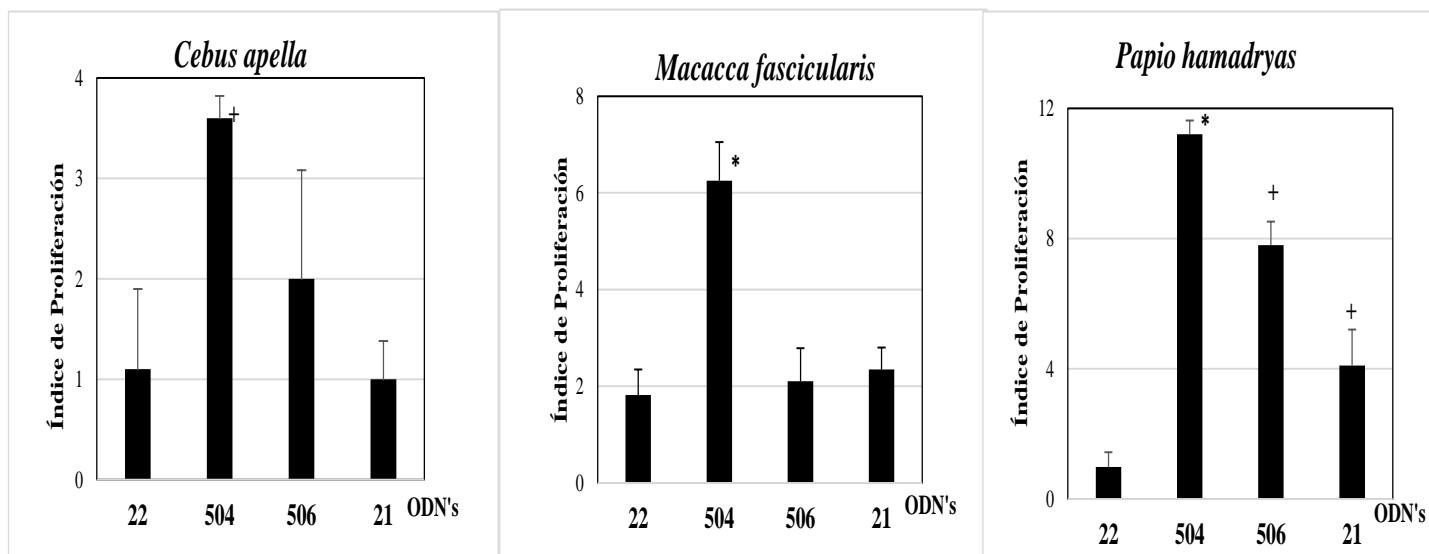
Ratones de la cepa Balb/c (6 por grupo) fueron inmunizados intramuscularmente con HBsAg solo (HBsAg) o con 20% v/v de alúmina/ALOOH (HBsAg + ALOOH). Los ODN PS se utilizaron 20µg/dosis/animal, ODN 1826 (HBsAg +ALOOH+1826), ODN 504 (HBsAg +ALOOH + 504) y ODN 1826 CG inv (HBsAg+ALOOH + 1826 CG inv). Cada barra representa el promedio del título de anticuerpos anti HBsAg en el suero de los animales ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba t de Student con respecto al resto de los grupos.

La respuesta de anticuerpos anti-HBsAg demuestra claramente la acción adyuvante de la alúmina.

El agregado del ODN 504 o del 1826 CG invertido no mejoraron este nivel de respuesta. El único oligonucleótido que marcó de manera significativa un aumento en la respuesta de anticuerpos fue el ODN CpG 1826. Estos resultados establecen claramente que en ratón el ODN 504 perteneciente a la serie *PyNTTTTGT* no es activo como adyuvante inmunológico.

En función de los resultados obtenidos en ratón y teniendo en cuenta lo reportado en la bibliografía, evaluamos la actividad *in vitro* de los ODN's *PyNTTTTGT* en primates no humanos. Teniendo en cuenta la actividad en humanos, buscamos las especies de primates más próximos. En primera instancia, testeamos la actividad de dos oligonucleótidos con distinta secuencia del motivo *PyNTTTTGT* en diferentes especies del orden Primate: *Macacca fascicularis*, *Cebus apella* y *Papio amandryas*. En la figura B3 se muestra la actividad *in vitro* de los oligonucleótidos: 504; 506; 21 y el ODN 22 como control negativo.

**Figura B3. Inducción de la proliferación en CMSP de diferentes especies del orden Primate estimuladas con oligonucleótidos *PyNTTTTGT*.**



El promedio mostrado proviene de 4 ensayos realizados con CMSP proveniente de animales diferentes. El índice de proliferación fue calculado por cuadruplicado. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 6µg/ml. La diferencia significativa fue indicada con (+) correspondiente a un  $p < 0.5$  y con (\*) con un  $p < 0.001$  con respecto al ODN 022 por la prueba t de Student.

La mayor actividad se observó con el ODN 504 en células provenientes de *M. fascicularis* y de *P. hamadryas*. Este oligonucleótido tiene una A en el motivo *PyNTTTTGT* luego de la *Py*, mientras que el ODN 506 tiene una T, esta diferencia se refleja en una leve disminución de la actividad proliferativa. La actividad del ODN 22 en todos los casos fue prácticamente nula.

La especie *P. hamadryas* se encuentra más cercana filogenéticamente a los humanos, y es la especie dentro de los primates no humanos evaluados, que presentó mayor actividad de los ODN's *PyNTTTTGT* y en la cual el ODN 21 presentó actividad.

Teniendo en cuenta estos resultados el oligonucleótido más efectivo parecería responder a la fórmula *PyPuTTTTGT*. Cabe destacar que no todos los marcadores inmunológicos fueron testeados en monos, por consiguiente estas conclusiones se limitan solo a la proliferación celular.

Estos resultados demostraron *in vitro* el efecto inmunoestimulante de los oligonucleótidos no-CpG *PyNTTTTGT* en monos. Sin embargo, debido a que la disponibilidad de estos animales para ser utilizados en ciencia es limitado, en paralelo evaluamos la actividad inmunoestimulante en otras especies. La evaluación *in vitro* en otras especies animales (cerdo, oveja) indicó que la actividad desarrollada por el ODN no CpG 504 es baja con respecto a la actividad que presentó el ODN 2006, tabla B2.

**Tabla B2. Actividad inmunoestimulante de ODN's *PyNTTTTGT* y ODN's CpG en diferentes especies.**

ODN's (PS)	Especies				
	<i>Humano</i>	<i>Mono</i>	<i>Cerdo</i>	<i>Oveja</i>	<i>Ratón</i>
<b>2006</b>	+	+	+	+	+
<b>504</b>	+	+	±	±	-
<b>505</b>	+	±	-	-	-
<b>506</b>	+	±	-	-	-

Los datos provienen de la proliferación de Células Mononucleares de sangre Periférica de humano, mono, cerdo, oveja y de esplenocitos de ratón estimuladas con ODN's CpG y *PyNTTTTGT* (0.375µg/mL). Los resultados se muestran como: + = alta proliferación, ± = baja proliferación y - = nula proliferación.

Hasta el momento carecíamos de un modelo *in vivo*, exceptuando de los primates no humanos. Este hecho nos impedía desarrollar estudios *in vivo* estadísticamente significativos.

Durante el transcurso de un estudio de toxicidad aguda realizado en ratas, observamos que luego de la inoculación de grandes cantidades del ODN 504 (4-20mg/Kg), el bazo de estos animales incrementaba su tamaño significativamente, foto y figura B4.

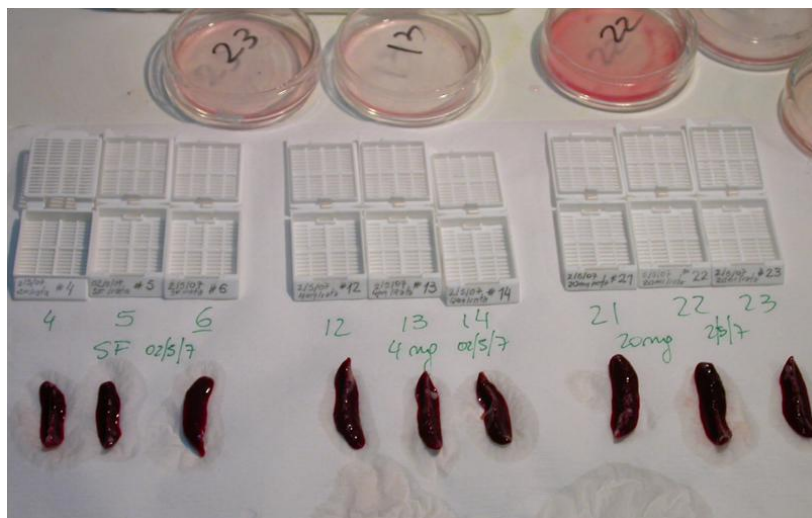
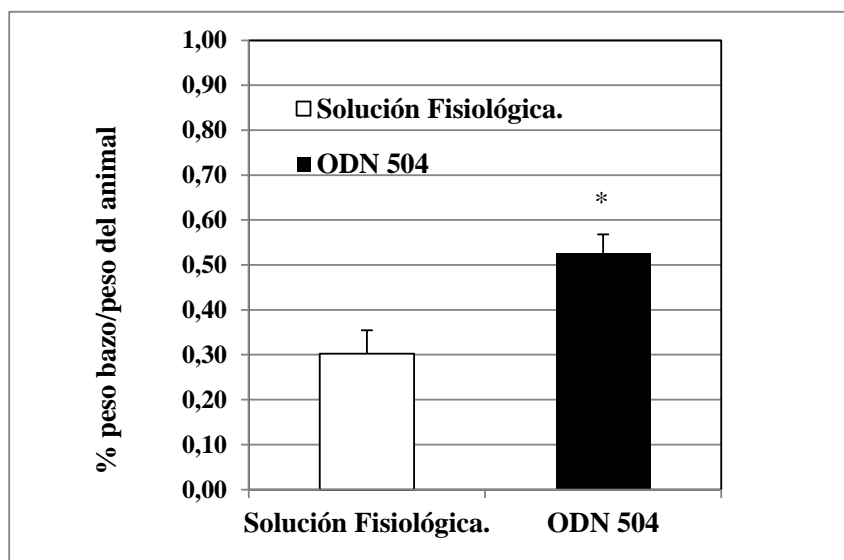


Foto ilustrativa del bazo de los animales inoculados de izquierda a derecha con: Solución Fisiológica (S.F.), ODN 504, 4mg/Kg y 20mg/kg.

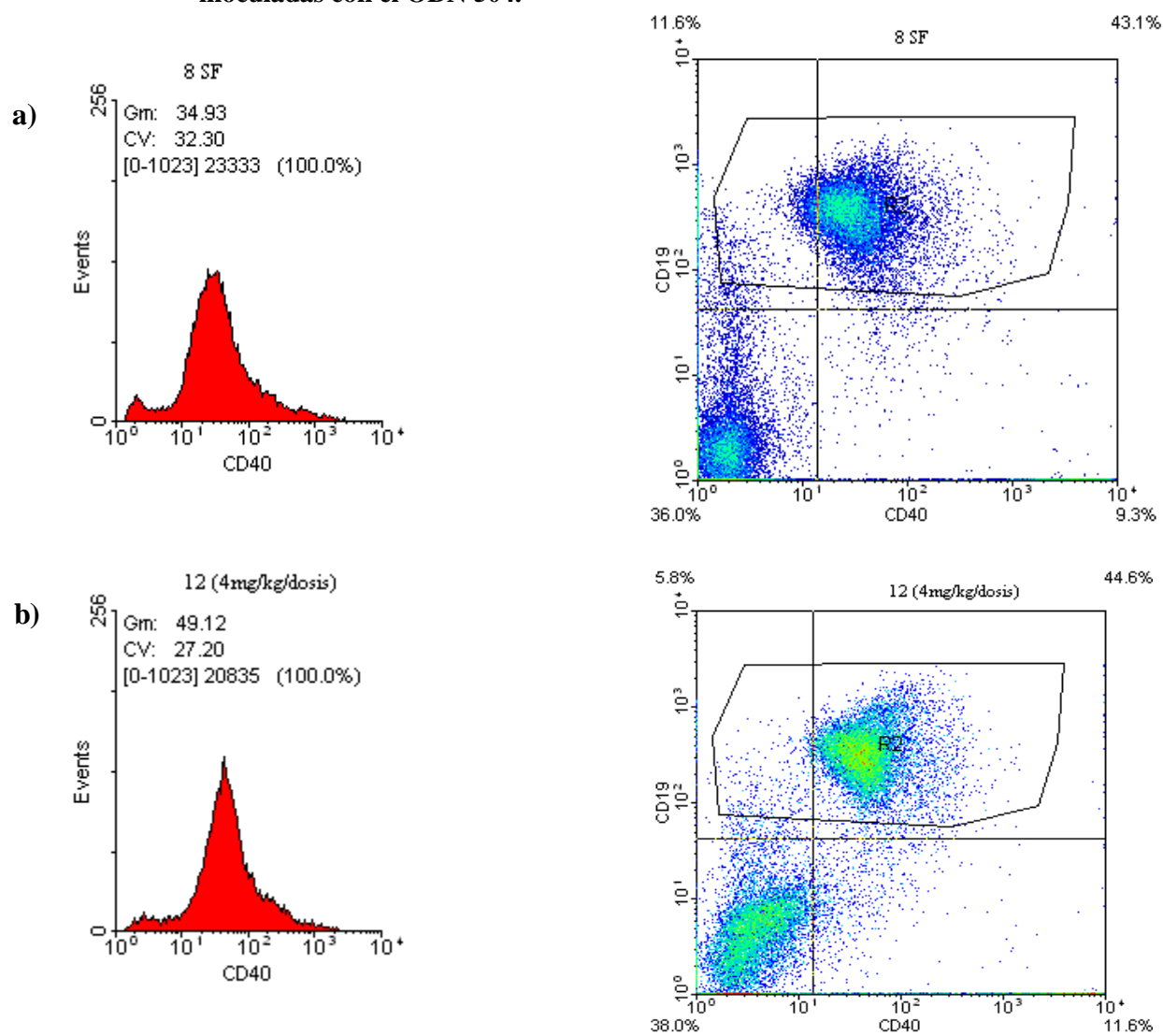
**Figura B4:** Efecto del ODN 504 en el bazo de ratas Sprague-Dawley.



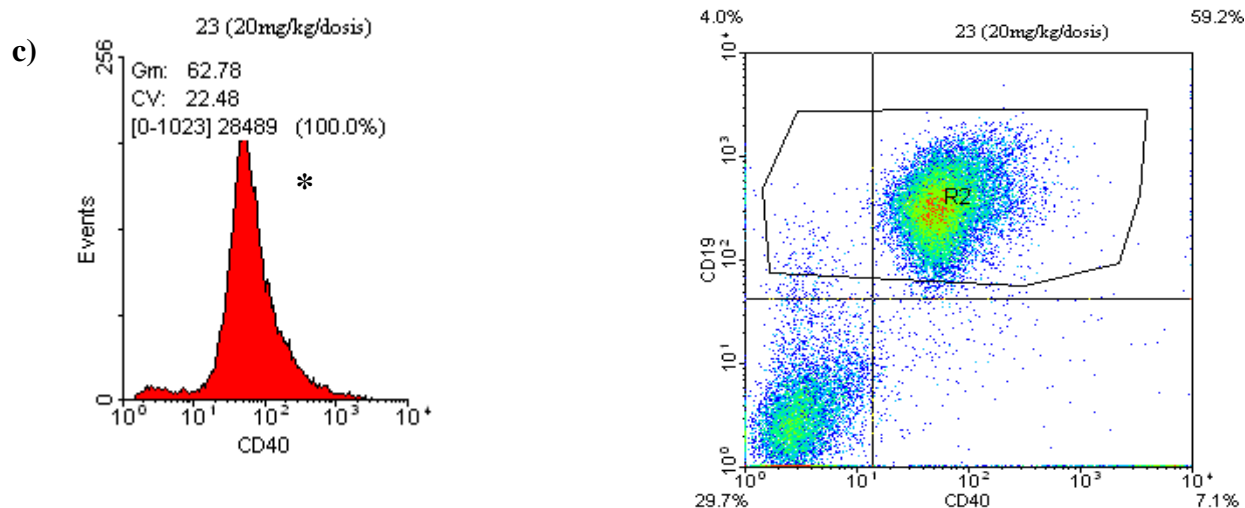
Los datos provienen de 3 (tres) experimentos independientes de 5 (cinco) animales por cada grupo experimental. Los animales fueron inoculados con 5 (cinco) dosis (una por día) con Solución Fisiológica (□) o 20 mg/kg/dosis de ODN 504 (■) por vía sub-cutánea. Todos los animales fueron procesados 2 (dos) días después de suministrar la última dosis. Las barras representan el porcentaje (%) del promedio del peso de los bazo/peso de los animales de cada grupo experimental + el desvío estándar. La diferencia significativa  $p < 0,01$  por la prueba t de Student fue indicada con un (\*).

Como se observa en los dot plots de la figura B5, en los animales inoculados con el ODN 504 aumenta la expresión del marcador  $CD40^+$  comparado con los que recibieron Solución Fisiológica (grupo control). Además, el porcentaje de células  $CD45R^+CD40^+$ , células B activadas, aumentó de manera significativa en los animales que recibieron 20mg/Kg con respecto a los controles.

**Figura B5:** Expresión de CD40 en células B (CD45R<sup>+</sup>) en esplenocitos de ratas Sprague-Dawley inoculadas con el ODN 504.







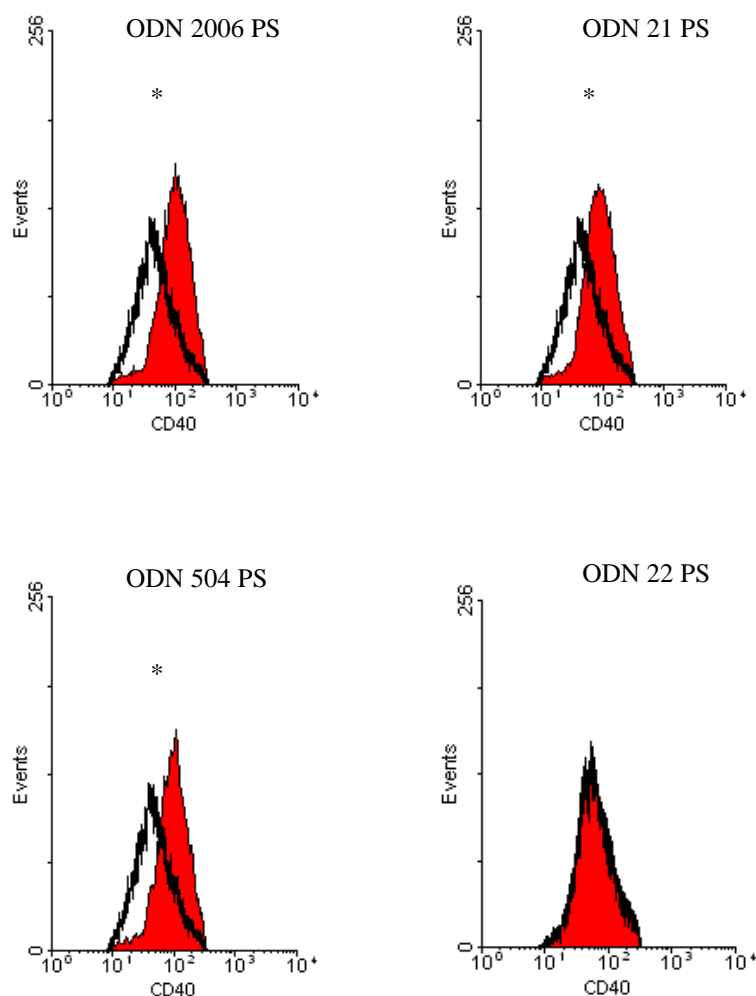
A modo de ejemplo se representan los esplenocitos provenientes de un animal inoculado con cinco dosis diarias de: a) Solución Fisiológica (S.F). b) ODN 504 4mg/Kg y c) ODN 504 20mg/K fueron teñidas 2 días post-última dosis con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD45R-PE/anti-CD40-Fitc. Los histogramas corresponden al gate de células CD45R<sup>+</sup>. El experimento fue repetido 3 veces con células de diferentes animales y en todos los casos se observaron resultados similares. La diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo S.F. fue indicada con (\*) por la prueba t de Student.

Esta observación sugirió la posibilidad de utilizar los ODN's *PyNTTTTGT* en rata. También evaluamos *in vitro* la actividad inmunoestimulante en sangre periférica en estos animales. Como se observa en la tabla B3 y figura B6, el ODN 504 presentó actividad en ratas de la cepa Sprague-Dawley. Resultados similares fueron obtenidos en ratas de la cepa Wistar (datos no mostrados).

**Tabla B3. Evaluación de la actividad inmunoestimulante del ODN 504 *in vitro* en rata.**

ODN (S)	Secuencia (5'--->3')	Índice de Proliferación		
		Prom.	N	SD
ODN 2006	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	6.5	6	0.35
ODN 021	TGCTGCTTTTTGTGCTTTTTGTGCTT	4.2	6	0.42
ODN 504	TCATCATTGTCATTTGTCATT	5.6	6	0.39
ODN 022	TGCTGCAAAAGAGCAAAAGAGCAA	1.1	6	0.54
Medio (RPMI)	---	1.0	6	0.23

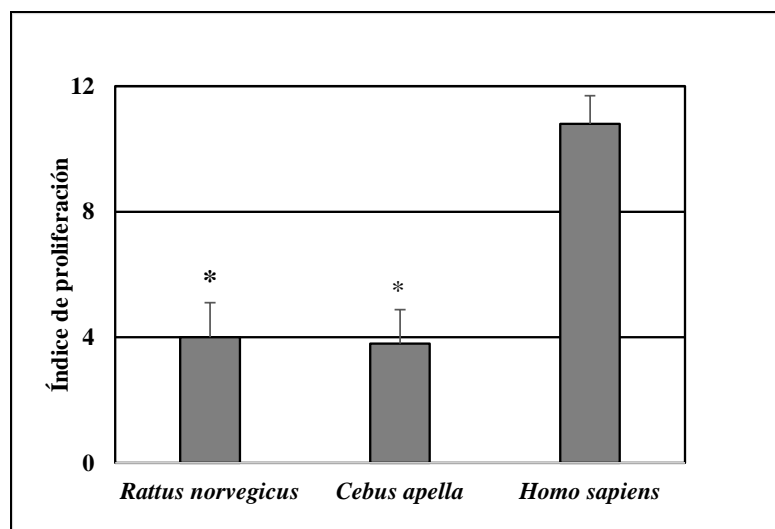
El promedio mostrado proviene de N ensayos realizados en sangre periférica de ratas de la cepa Sprague-Dawley proveniente de animales diferentes. El desvío estándar (SD). Los ODN's con uniones fosfotioato (S). El índice de proliferación fue calculado por cuadruplicado. Los cultivos fueron estimulados con una concentración de ODN de 6µg/ml.

**Figura B6. Expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en células B de rata *in vitro*.**

Esplenocitos provenientes de rata fueron cultivados y estimulados con el ODN 2006, ODN 21; ODN 504 y ODN 22 durante 48h en sus versiones PS en una concentración de 6µg/mL, luego fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD45R-PE/anti-CD40-Fitc. Las células sin estimular se indican en □ y las estimuladas con ODN con ■. El análisis de la citometría de flujo mostrado en los histogramas corresponde al gate de células CD45R+. El experimento fue repetido 6 veces con células de diferentes animales y en todos los casos se observaron resultados similares. La diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) con respecto a células sin estimular fue indicada con (\*) por la prueba t de Student.

Si comparamos la actividad que presenta el ODN 504 en las tres especies estudiadas: humanos, monos y ratas observamos que el índice de proliferación en humanos es aproximadamente cuatro veces superior a los valores encontrados en monos *Cebus apella* y ratas, figura B7. Estos resultados sugieren que tanto los monos como las ratas pueden ser utilizados como un modelo animal conservador para evaluar la acción de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT in vivo*.

**Figura B7. Comparación de la actividad inmunoestimulante del ODN 504 en ratas, monos y humanos.**



Estimulación en sangre periférica de ratas (*Rattus norvegicus*), monos (*Cebus apella*) y humanos (*Homo sapiens*) con el ODN 504. CMSP fueron cultivadas con 1.5µg de ODN 504 (PS) durante 72hs. El índice de proliferación se determinó comparado con células sin estimular. La diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba t de Student fue indicada con (\*) comparada con *Homo sapiens*.

El ODN 504 prototipo *PyNTTTTGT*, demostró ser activo en primates y ratas, aunque en estos animales la actividad observada fue menor que en humanos.

Hasta aquí, hemos descrito el descubrimiento de un grupo de oligonucleótidos no CpG con motivo *PyNTTTTGT* que promueven la activación, proliferación, secreción de IgM e IL-6 y la expresión de diferentes moléculas co-estimuladoras en células B y dendríticas plasmacitoides humanas.

El próximo punto, fue determinar si el efecto inmunoestimulante observado *in vitro* se refleja en una acción adyuvante *in vivo*. Por lo tanto, el siguiente objetivo fue evaluar la capacidad adyuvante del ODN 504 en vacunas, utilizando como modelo experimental monos de la especie *Cebus apella* y ratas de la cepa Sprague-Dawley.

## Capítulo C.

### **Evaluación de la actividad del ODN 504 como adyuvante de vacunas en monos.**

#### **Estrategias para la implementación de la vacuna contra la Hepatitis B. Fundamentos epidemiológicos.**

La inmunización contra el virus de la hepatitis B en humanos (VHB) es recomendada en todo el mundo, especialmente en países sub-desarrollados debido a que es la principal causa de enfermedad crónica del hígado y de fallecimiento en el mundo causado por enfermedades hepáticas (118, 119).

Con el objetivo de erradicar la enfermedad se recomienda la vacunación contra la hepatitis B a temprana edad. El esquema de vacunación consiste en tres dosis, la primera dosis dentro de las 72 hs. posteriores al nacimiento, la segunda dosis entre 1 y 2 meses posteriores a la primera dosis y la tercera a los 6 meses de vida (0, 1 y 6 meses). Sin embargo, en los países sub-desarrollados en muchas ocasiones la finalización del esquema de vacunación se ve interrumpido, por lo tanto encontrar una vacuna que sea efectiva con un menor número de dosis sería de gran importancia. Además, las vacunas formuladas en alúmina (ALOOH) no son efectivas en ciertos individuos de la población, como por ejemplo en personas de la tercera edad, obesos o personas con algún grado de compromiso inmunológico (120).

En consecuencia, la búsqueda de nuevos adyuvantes que puedan disminuir el número de dosis y mejorar la eficiencia de la vacuna de Hepatitis B continúa siendo objeto de investigación.

La actividad adyuvante del ODN no-CpG *PyNTTTTGT* (ODN 504) fue evaluada junto a la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> de los Laboratorios Pablo Cassará en monos de la especie *Cebus apella*.

#### **Inmunización en monos con la vacuna de Hepatitis B AgB<sup>®</sup> de Lab. Cassará.**

En este estudio se formaron 4 grupos de 4/5 animales cada uno de monos de la especie *Cebus apella*. Cada animal fue inmunizado por vía intramuscular con la vacuna AgB<sup>®</sup> de Laboratorios Pablo Cassará. Previo a la inoculación se obtuvo una muestra de sangre para llevar a cabo diferentes determinaciones.

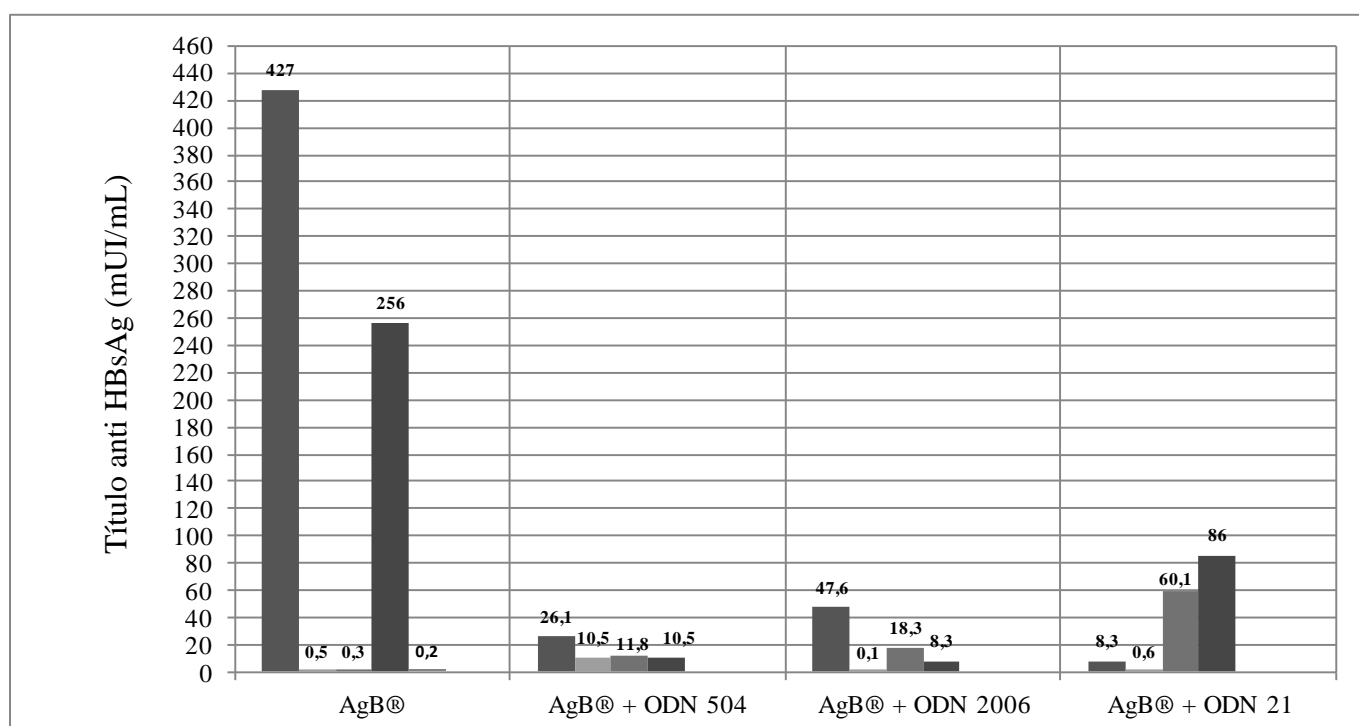
Los animales del “grupo control” recibieron al día 0 (cero) una dosis pediátrica de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> (10µg de HBsAg/0.25mg ALOOH). El resto de los grupos recibieron la misma dosis de

antígeno a la que previamente se le agregó 150µg de los diferentes oligonucleótidos, de esta manera se formaron los siguientes grupos: AgB<sup>®</sup> + ODN 2006; AgB<sup>®</sup> + ODN 504 y AgB<sup>®</sup> + ODN 21.

El esquema experimental planteado en primera instancia fue evaluar el título de anticuerpos específicos en sangre cada 2 (dos) semanas y luego de un mes de la primera dosis realizar un booster con la misma formulación que se aplicó al día 0.

En el siguiente gráfico (C1) se muestra la respuesta de anticuerpos anti-hepatitis B en monos *C. apella* a la segunda semana post-inmunización con la primera dosis.

**Gráfico C1. Título de anticuerpos en monos *C. apella* inmunizados con la vacuna AgB<sup>®</sup> más ODN's CpG y no CpG.**



Título de anticuerpos en *C. apella* inmunizados intramuscularmente con la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>, dosis pediátrica, 10 µg de HBsAg en alúmina (grupo Control) más 150 µg de ODN 504, ODN 2006 u ODN 21 según corresponda. Los valores representan el título de anticuerpos de cada animal anti HBsAg determinados por el método de Abbott (Ausab EIA, Abbott Laboratorios, Abbott Park) a la segunda semana post-inmunización.

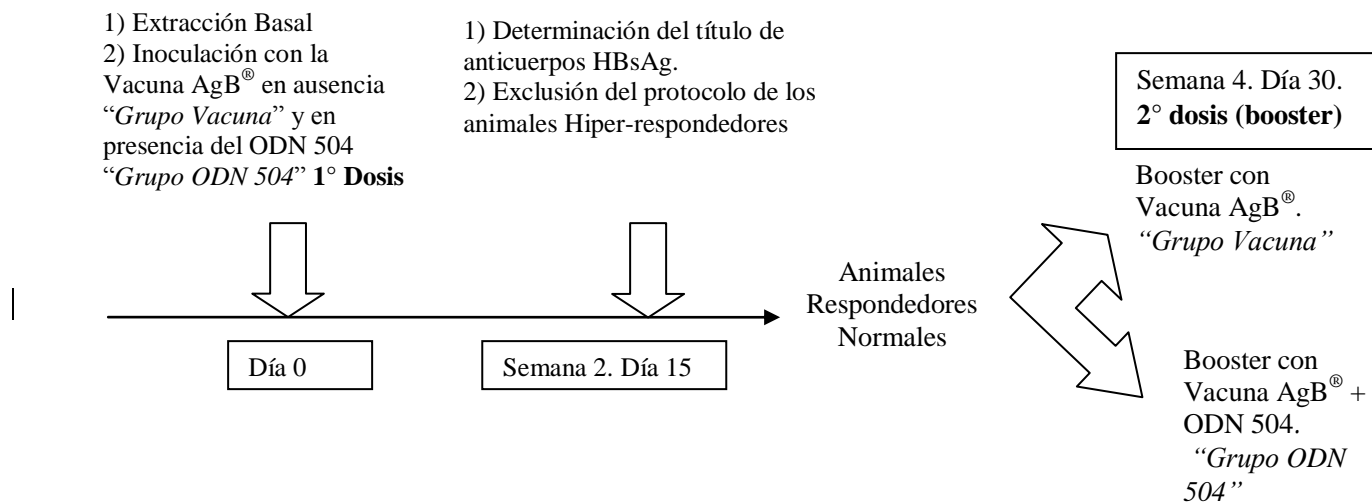
En el grupo que recibió solo la vacuna AgB<sup>®</sup>, dos de cinco animales (40%) respondieron con un elevado título de anticuerpos (427 y 256) en un tiempo muy corto luego de la vacunación (dos semanas). Estos valores exacerbados en el título de anticuerpos no se presentaron en ninguno de los grupos experimentales que recibieron ODN's (AgB<sup>®</sup> + ODN 504, AgB<sup>®</sup> + ODN 2006 o AgB<sup>®</sup> + ODN 21). Cabe destacar que en ninguna muestra del suero basal se detectaron anticuerpos específicos anti-hepatitis B.

Por otro lado, el grupo que recibió el ODN 504 presentó títulos de anticuerpos más homogéneos con respecto a los grupos que recibieron los ODN 2006 y 21.

En función de la anormalmente elevada respuesta de anticuerpos que presentaron algunos monos en el grupo AgB<sup>®</sup>, tuvimos que re-diseñar el análisis para evaluar la acción del ODN 504 como adyuvante. Para ello, inmunizamos un nuevo grupo de animales con la vacuna de AgB<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del ODN 504. En función de la limitada disponibilidad para trabajar con estos animales no pudimos evaluar la acción del ODN 2006 ni del ODN 21 en este nuevo protocolo de estudio.

El nuevo análisis consistió en excluir del protocolo a los animales que presentaban una hiper-respuesta hacia el antígeno de Hepatitis B, luego de dos semanas de inocular la primera dosis. El resto de los animales que no exhibían una respuesta de anticuerpos exacerbada, los consideramos como respondedores normales, y continuaron en el estudio para evaluar la acción adyuvante del ODN 504. Estos animales se sumaron en cada grupo (según corresponda) a los animales “respondedores normales” de la primera tanda de animales inmunizados previamente con la vacuna sola o con el ODN 504, con el objetivo de aumentar el N experimental.

En el siguiente esquema se muestra el nuevo diseño experimental utilizado en monos *Cebus apella*.



En esta nueva tanda de inmunización en el “Grupo Vacuna” dos de cinco animales (40%) presentaron niveles elevados de anticuerpos (452 y 195), estos animales fueron excluidos del diseño experimental. Sin embargo, ningún animal que recibió la vacuna junto al ODN 504 presentó valores exacerbados en la respuesta de anticuerpos.

En la tabla C1, se puede observar que luego de dos semanas de recibir la primera dosis, todos los animales del “Grupo ODN 504” seroconvirtieron, mientras que ningún animal del “Grupo Vacuna” presentó valores de seroconversión a este tiempo. En la semana 4 post primera dosis solo el 50% de los animales del “Grupo Vacuna” presentaron valores seroprotectivos. Además, una segunda dosis fue necesaria en el “Grupo Vacuna” para que la totalidad de los animales inmunizadas presenten valores seroprotectivos. El límite de seroconversión se consideró  $\geq 10,0$  mUI/ml (119).

**Tabla C1. Evaluación de la actividad del ODN 504 luego de un booster en monos *C. apella*.**

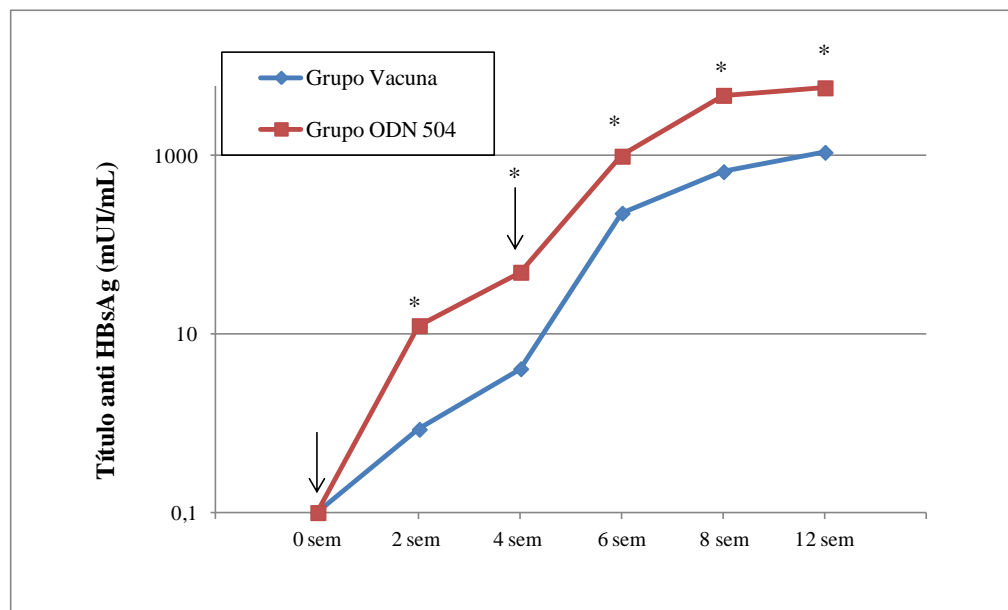
	Semana 2	Semana 4	Semana 6	Semana 8	Semana 12
"Grupo Vacuna"	Títulos de Anticuerpos mUI/mL				
	0,5	<b>28,8</b>	<b>226,9</b>	<b>821</b>	<b>2480</b>
	0,3	0,1	<b>154</b>	<b>165</b>	<b>276</b>
	0,2	<b>15</b>	<b>135,7</b>	<b>587</b>	<b>750</b>
	0,6	1,9	<b>525</b>	<b>2199</b>	<b>3154</b>
	1,8	<b>14,6</b>	<b>275</b>	<b>1520</b>	<b>1420</b>
	0,7	1,6	<b>210</b>	<b>335</b>	<b>780</b>
"Grupo ODN 504"	<b>26,1</b>	<b>202,5</b>	<b>1000</b>	<b>9221</b>	<b>10353</b>
	<b>10,5</b>	<b>195,8</b>	<b>464,8</b>	<b>3951</b>	<b>6656</b>
	<b>11,8</b>	<b>17</b>	<b>511,8</b>	<b>2195</b>	<b>2756</b>
	<b>10,5</b>	<b>16</b>	<b>680</b>	<b>4500</b>	<b>6520</b>
	<b>10,3</b>	<b>25</b>	<b>750</b>	<b>5600</b>	<b>4890</b>
	<b>10,9</b>	<b>56</b>	<b>8100</b>	<b>6100</b>	<b>6500</b>

Título de anticuerpos en *C. apella* inmunizados con dos dosis (semana 0 y 4) intramuscularmente con la vacuna AgB<sup>®</sup> en ausencia (Grupo Vacuna) o en presencia de 150µg de ODN 504 (Grupo ODN 504). A diferentes tiempos post-inmunización se determinó el título de anticuerpos anti HBsAg de cada animal por el método de Abbott (Ausab EIA, Abbott Laboratorios, Abbott ParK). En negrita los valores  $\geq 10$ mUI/mL.

El incremento en la respuesta de anticuerpos en los animales que recibieron el ODN 504 se evidenció durante todo el tiempo de estudio. El mayor incremento respecto al control se manifestó a las dos semanas post-primera dosis, observándose en promedio 19 (diecinueve) veces más título de anticuerpos anti HBsAg. Luego de este tiempo, desde la semana 4 hasta la 12, los niveles de anticuerpos en el Grupo ODN 504 se mantuvieron aumentados entre 5 (cinco) y 8 (ocho) veces con respecto al Grupo Vacuna.

Con el agregado del ODN 504 a la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> se obtiene en menor tiempo una respuesta de anticuerpos cuantitativamente y significativamente superior, protegiendo a un mayor porcentaje de animales, gráfico C2.

**Gráfico C2. Título de anticuerpos en monos *C.apella* inmunizados con la vacuna comercial AgB® en ausencia o presencia del ODN 504.**



Título de anticuerpos en *C. apella* inmunizados intramuscularmente con la vacuna AgB® en ausencia (Grupo Vacuna) o en presencia de 150µg de ODN 504 (Grupo ODN 504). Las flechas indican los tiempos de inmunización. Los valores representan la media geométrica a diferentes tiempos post-inmunización 2/4/6/8 y 12 semanas. El grupo control se representa como ■ y el grupo que recibió el ODN 504 como ■. Los anticuerpos anti HBsAg fueron determinados por el método de Abbott (Ausab EIA, Abbott Laboratorios, Abbott ParK). El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Estos resultados demostraron *in vivo* el efecto adyuvante del ODN prototipo *PyNTTTTGT* en monos. Sin embargo, debido a que el uso de estos animales se ve limitado por el número reducido de cada colonia, decidimos evaluar la actividad del ODN 504 junto a la vacuna AgB® (AgB de Lab. Cassará) en ratas de la cepa Sprague-Dawley con el objetivo de aumentar el N experimental.

### **Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 en ratas Sprague-Dawley.**

La posibilidad de utilizar a las ratas como modelo animal nos permitió evaluar la actividad del ODN 504 en diferentes condiciones. Por lo tanto, nos pareció interesante evaluar primero la capacidad del ODN 504 en estimular la producción de anticuerpos específicos anti-HBsAg en ausencia de alúmina. Estos resultados nos ayudarían a determinar en que magnitud el ODN 504 presenta actividad adyuvante *in vivo per se*, y de esta manera establecer la actividad adyuvante conjunta con la alúmina y el ODN 504 en futuros ensayos.

Se conformaron 3 (tres) grupos de 16 animales cada uno de ratas Sprague-Dawley de 6-8 semanas de edad. Cada uno de los grupos recibió las siguientes dosis: 1µg, 3µg y 9µg del antígeno de superficie del

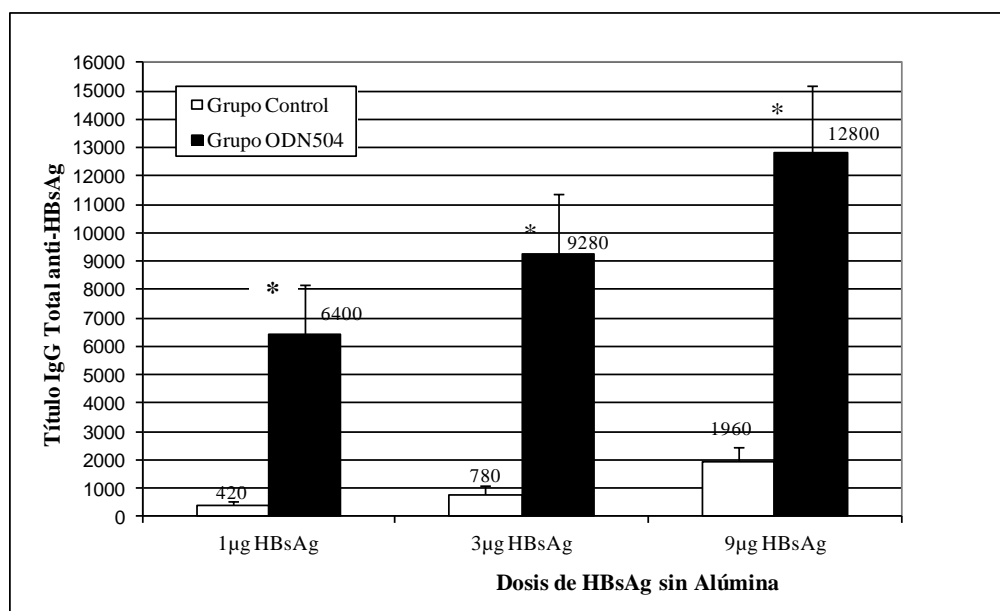


virus de Hepatitis B recombinante (HBsAg). A la mitad de los animales (8) de cada grupo, se les administró el antígeno en ausencia del ODN 504 (Grupo Control), y a la otra mitad en presencia de 50µg del oligonucleótido 504 (Grupo ODN 504).

El esquema de inmunización consistió en la inoculación de una única dosis por vía intramuscular en el cuadriceps de la pata trasera izquierda. A los 30 (treinta) días post-inoculación (dpi) se obtuvieron muestras de sangre a las cuales se les separó el suero, y se determinó el título de anticuerpos específicos anti HBsAg mediante la técnica ELISA desarrollada en nuestro laboratorio.

En el siguiente gráfico C3 se representan los promedios de los títulos de IgG Total específica en los grupos controles y los que recibieron el ODN 504 como único adyuvante.

**Gráfico C3. Respuesta de anticuerpos hacia el antígeno HBsAg en ausencia o en presencia del ODN 504.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (8 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 1-3-9µg de HBsAg sin ODN, grupo control, o con el agregado de 50 µg de ODN 504 por animal, grupo ODN 504. Cada barra representa el promedio del título de IgG Total anti HBsAg en cada grupo experimental. Los asteriscos (\*) indican la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control. Este experimento se repitió tres veces y se obtuvieron resultados similares.

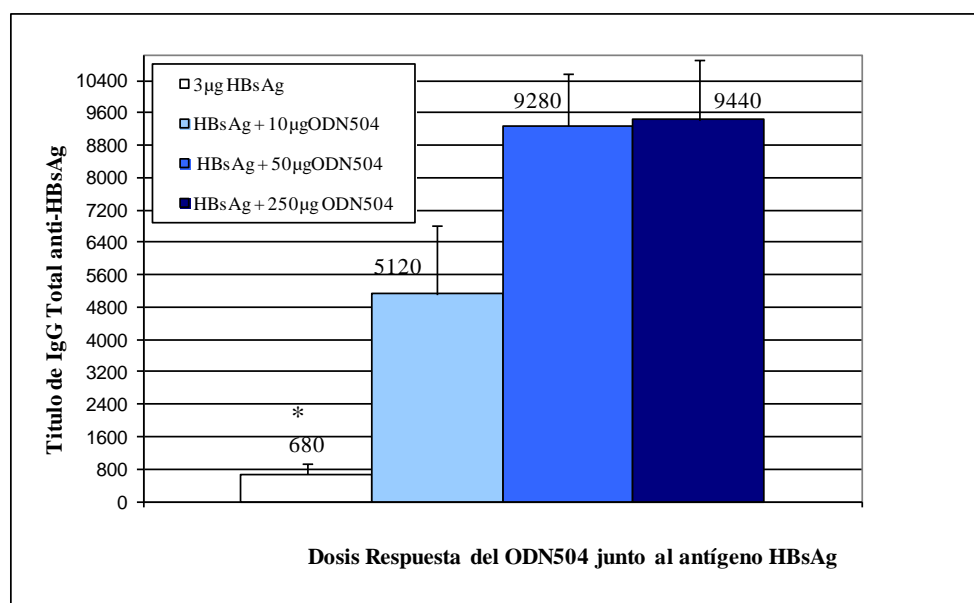
Como se puede observar en todas las dosis estudiadas los animales que recibieron el ODN 504 presentaron títulos de anticuerpos superiores a sus respectivos controles.

La respuesta más alta generada en los grupos controles la encontramos en la dosis de 9µgHBsAg (1980), sin embargo esta respuesta es menor a la obtenida en el grupo ODN 504 que recibió 1µg de HBsAg (6400).

Estos resultados demuestran que la actividad inmunoestimulante de los ODN's *PyNTTTTGT* encontrada *in vitro* se correlaciona con la actividad adyuvante del ODN 504 *in vivo* en ratas.

La actividad adyuvante observada por el ODN 504 en ratas, se evidenció empleando 50µg del oligonucleótido por animal. Por lo tanto resultó interesante evaluar la respuesta con diferentes concentraciones del adyuvante. De esta manera, diseñamos un ensayo dosis-respuesta del ODN 504 donde se inmunizaron animales con una cantidad fija del antígeno recombinante de HBsAg (3µg) en ausencia y en presencia de 10, 50 y 250µg. del ODN 504. Transcurrido un mes, se obtuvieron muestras de suero de cada animal y se determinó el título de anticuerpos específicos anti-HBsAg como se describió anteriormente, gráfico C4.

**Gráfico C4. Respuesta de anticuerpos hacia el antígeno HBsAg en presencia de diferentes concentraciones del ODN 504.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 3µg de HBsAg sin ODN, grupo 3µg HBsAg, o con el agregado de 10 µg, 50µg o 250µg de ODN 504 por animal, grupo HBsAg + xµgODN 504. Cada barra representa el promedio del título de IgG Total anti HBsAg en cada grupo experimental. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test del grupo control (3µg HBsAg) con respecto a los grupos que recibieron el ODN 504. Este experimento se repitió dos veces y se obtuvieron resultados similares.

Una vez más, pudimos comprobar la actividad adyuvante del ODN 504 en todas las dosis estudiadas. Aún en la dosis más baja del ODN 504 (10µg) la respuesta de anticuerpos aumentó aproximadamente 8 (ocho) veces con respecto al grupo control (5120 vs 680). Sin embargo en ninguna condición, inclusive con la máxima concentración del oligonucleótido, se superaron los valores en el título de anticuerpos obtenidos anteriormente.

Tomando en conjunto todos los resultados, podemos concluir que en ratas la dosis adecuada de antígeno recombinante de HBsAg es de 3µg/dosis y la de ODN 504 de 50µg/dosis.

En función de la acción adyuvante que presentó el ODN 504 y la alúmina junto al antígeno de Hepatitis B en monos, el siguiente objetivo planteado por nosotros fue evaluar la acción conjunta de ambos adyuvantes en ratas. De esta manera se planificó un nuevo protocolo utilizando la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> proveniente de los Laboratorios Pablo Casará, en esta formulación el antígeno recombinante (HBsAg) se encuentra adsorbido a la alúmina.

### **Inmunización en ratas Sprague-Dawley con la vacuna comercial de Hepatitis B, AgB<sup>®</sup> del Laboratorio Cassará.**

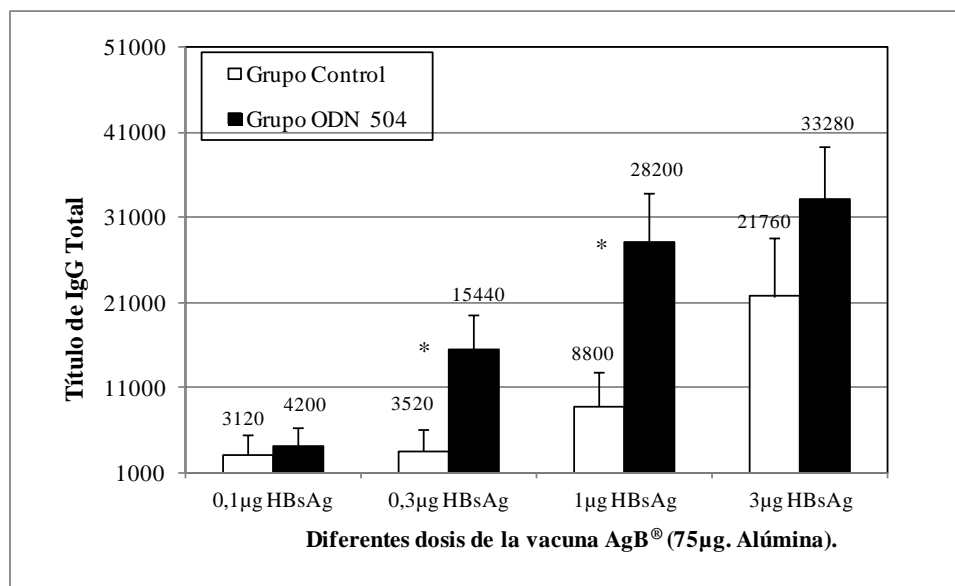
En este estudio, se inmunizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley de 6-8 semanas de edad con la vacuna comercial de Hepatitis B, AgB<sup>®</sup> (Pablo Cassará SRL, Buenos Aires). El esquema de inmunización utilizado fue similar al protocolo anterior.

La concentración de antígeno HBsAg de la vacuna comercial dosis adulta, es de 20µg adsorbido en 0.5mg de ALOOH/mL. Por lo tanto, en función del volumen de inoculación empleado en ratas (0.15 mL), cada animal recibió 3µg de HBsAg adsorbido a 75µg de ALOOH (alúmina). En el caso de aquellos animales que recibieron el adyuvante se le agregó 50µg de ODN 504 por dosis.

Además, evaluamos dosis menores a 3µg de antígeno de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>, en ausencia (grupo control) y en presencia del adyuvante ODN 504 (grupo ODN 504). Para ello se realizaron diluciones de la vacuna hasta obtener la masa de antígeno HBsAg deseada: 0.1µg, 0.3µg y 1µg/dosis. En estas dosis, para mantener constante la masa de alúmina en cada preparación (75µg ALOOH) fue necesario agregar alúmina extra a cada una de las formulaciones antes mencionadas.

En el siguiente gráfico C5 se representa el título de anticuerpos IgG Total a los 30 días post inmunización en el suero de los animales que recibieron la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> en ausencia (grupo control) o presencia del ODN 504 (grupo ODN 504). Curiosamente, se puede observar que la respuesta generada con la vacuna comercial en la dosis más alta (3µg HBsAg) en ambos grupos es del mismo orden, el leve aumento observado en el grupo ODN 504 (33280) no representa ni una dilución al medio con respecto a la respuesta del grupo control sin ODN 504 (21760).

**Gráfico C5. Título de Anticuerpos IgG Total en ratas inmunizadas con diferentes dosis de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> en ausencia o en presencia del ODN 504.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (8 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 0,1, 0,3, 1 y 3µg de la vacuna AgB<sup>®</sup> (dosis adulta) sin ODN, grupo control, o con el agregado de 50µg de ODN 504 por animal, grupo ODN 504. Las dosis correspondientes a 0,1, 0,3 y 1µg se les agregó 75µg de Alúmina/dosis/animal. Cada barra representa la media del título de IgG Total anti HBsAg de cada grupo con su correspondiente desvío estándar. Los asteriscos (\*) indican la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control. Este experimento se repitió dos veces y se obtuvieron resultados similares.

Cuando evaluamos la respuesta generada en el resto de las dosis, a diferencia de lo observado con la dosis de 3µg., el efecto adyuvante del ODN 504 se reflejó con las dosis de 0,3µg y 1µg de HBsAg. Como se mencionó anteriormente, a las dosis 0,1µg, 0,3µg y 1µg se les agregó alúmina con el objetivo de mantener constante la masa de este adyuvante respecto a la dosis de 3µg. De esta manera, a menor concentración de antígeno la relación antígeno-alúmina fue menor.

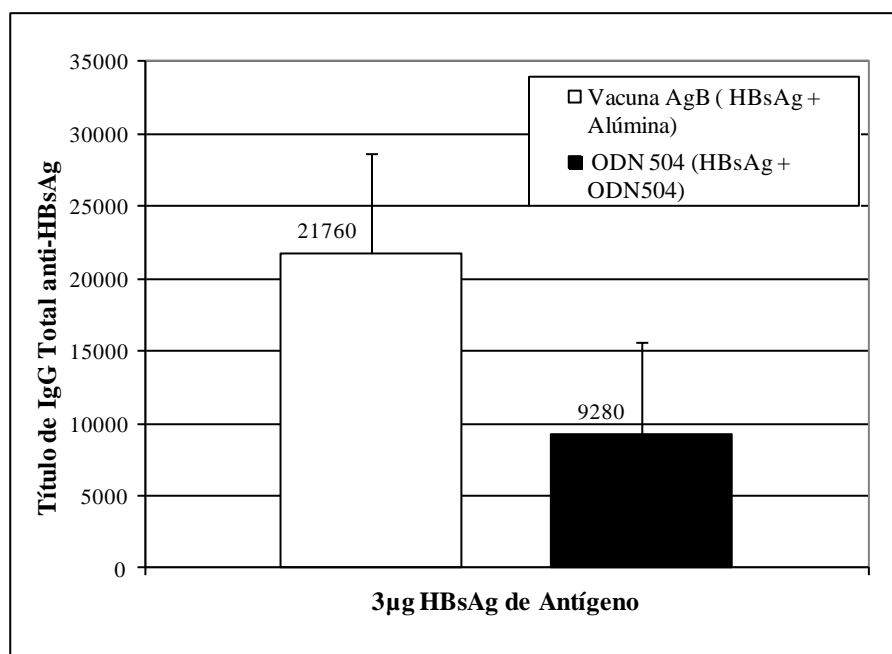
Nosotros pensamos que quizá, el agregado de alúmina extra en los grupos 0,3µg y 1µg, permitió la formación de compuestos ternarios (antígeno-ODN 504-alúmina) favoreciendo de esta manera el desarrollo de la actividad del ODN 504, mientras que en la dosis de 3µg la relación antígeno-alúmina es limitante, de manera que al agregar el ODN 504 la probabilidad de formar estos compuestos se encontraría disminuída, y en consecuencia el ODN 504 no ejerció su actividad adyuvante. Por lo tanto, la concentración de alúmina jugaría un rol importante en el establecimiento de la actividad adyuvante del ODN 504

En la menor dosis testeada en este estudio (0,1µg) la respuesta generada es baja y no se observó el efecto adyuvante del ODN 504, a pesar que en esta dosis la cantidad de alúmina agregada fue superior con respecto al resto de las dosis testeadas. En esta condición, la concentración de antígeno sería limitante y, en

consecuencia ni el agregado extra de alúmina ni del oligonucleótido pueden generar una respuesta inmune adecuada.

Cuando comparamos la acción adyuvante de la alúmina versus el ODN 504, pudimos observar que la respuesta generada por ambos adyuvantes fue similar. Si bien, se puede observar un leve aumento en el grupo Vacuna AgB<sup>®</sup>, la misma se encuentra representada aproximadamente por una dilución más, al medio, con respecto al grupo ODN 504 (21760 vs. 9280), gráfico C6.

**Gráfico C6. Comparación de la actividad adyuvante de la alúmina y el ODN 504 junto al antígeno de Hepatitis B (HBsAg).**



Los resultados representan el promedio del título de anticuerpos IgG Total anti-HBsAg de los grupos experimentales (Control/3µg HBsAg en 75µg de alúmina) de la figura C5 y de la figura C4 (3µg HBsAg + 50µg ODN 504).

Hasta aquí, tomando en conjunto todos los resultados podemos concluir que la respuesta generada por el ODN 504 se encuentra en el orden de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>.

Con el objetivo de evaluar el rol que cumple la concentración de alúmina en la actividad adyuvante del ODN 504, solicitamos al Laboratorio Pablo Cassará el antígeno recombinante de hepatitis B (HBsAg) y la alúmina por separado.

## **Inmunización en ratas de la especie Sprague-Dawley utilizando el antígeno recombinante de hepatitis B (HBsAg) con alta concentración de alúmina, en ausencia y en presencia del ODN 504.**

Para testear la acción del ODN 504 con una alta concentración de alúmina, el antígeno recombinante de HBsAg fue mezclado al 25% v/v de alúmina, este porcentaje de alúmina equivale a 500µg por dosis, es decir casi 7 (siete) veces más a la cantidad de alúmina presente en la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>.

Luego de haber realizado diferentes curvas de saturación se optó por utilizar esta cantidad de alúmina debido a que en esta condición no se evidenció ni antígeno ni oligonucleótido libre (datos no mostrados). Con esta cantidad de alúmina se testearon diferentes concentraciones de HBsAg por dosis (1-3 y 9µg), con el objetivo de determinar la dosis óptima de antígeno en ratas. Todas las dosis se realizaron en presencia de 500µg de alúmina en ausencia (grupo control) o en presencia de 50µg de ODN 504 (grupo ODN 504).

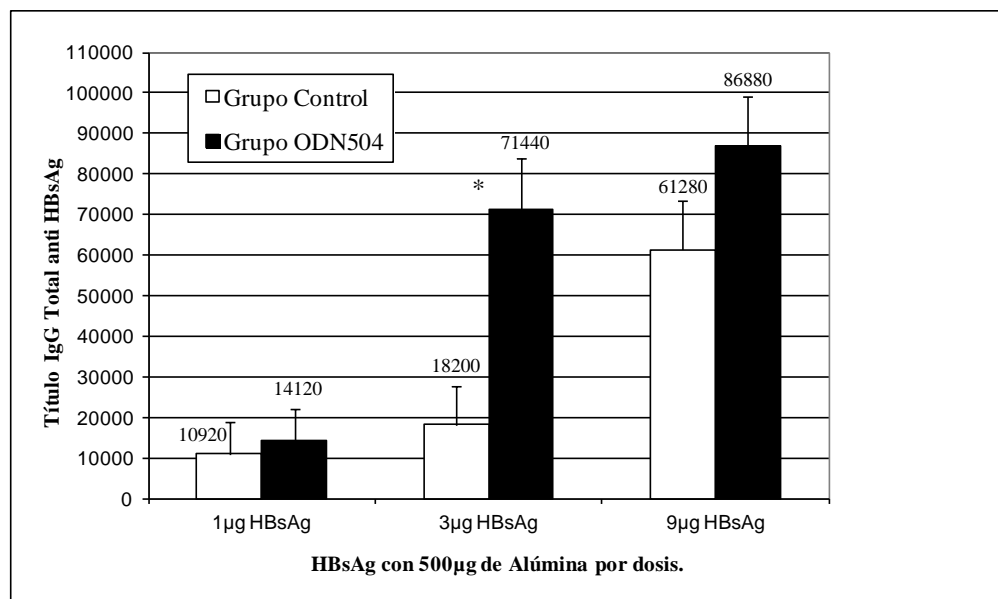
El esquema de inmunización empleado fue similar al utilizado con la vacuna comercial.

Como se observa en el gráfico C7, solo el grupo que recibió 3µg de antígeno en presencia de ambos adyuvantes, presentó una respuesta de anticuerpos específica significativamente superior al grupo control. Esta respuesta fue la más alta obtenida hasta el momento, demostrando que la actividad de ambos adyuvantes es complementaria.

Si comparamos la respuesta obtenida en presencia del ODN 504 utilizando una baja concentración de alúmina (gráfico C5) versus una alta concentración de la misma (gráfico C7), se puede observar una discrepancia entre las dosis donde se manifiesta la actividad adyuvante del oligonucleótido. Por ejemplo, cuando se utiliza la vacuna AgB<sup>®</sup> con una baja concentración de alúmina (75µg) la dosis de 1µg presenta adyuvancia, mientras que la dosis de 3µg no la presenta. Sin embargo, utilizando una mayor cantidad de alúmina (500µg) estas mismas dosis presentan resultados diferentes.

Una posible explicación a estas discrepancias es que además de la variación con respecto a la masa de alúmina empleada (75 vs 500µg), la formulación de alúmina más antígeno en la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> tiene un procedimiento de elaboración a escala industrial (realizada en reactores), diferente al empleado en las formulaciones del antígeno (HBsAg) más una alta cantidad de alúmina (500µg) y el ODN 504, realizado por pipeteo en el laboratorio. Debido a que este tipo de formulación fue elaborada con un protocolo diferente, podría haber sucedido que el ODN 504 no se haya incorporado a los complejos antígeno-alúmina.

**Gráfico C7. Título de Anticuerpos IgG Total en ratas inmunizadas con diferentes dosis de HBsAg en 500µg de alúmina, en ausencia o en presencia del ODN 504.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (20 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 1-3-9µg de HBsAg más 500µg de alúmina sin ODN, Grupo Control, o con el agregado de 50µg de ODN 504 por animal, Grupo ODN 504. Cada barra representa la media del título de IgG Total anti HBsAg de cada grupo. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control. Este experimento se repitió dos veces y se obtuvieron resultados similares.

Hasta aquí, nuestros resultados demuestran la actividad adyuvante del ODN 504 junto al antígeno de HBsAg, siendo esta actividad marcadamente superior cuando en la formulación se incluye la alúmina en una alta concentración.

### **Evaluación de la influencia del ODN 504 en el establecimiento de la respuesta T, Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub>.**

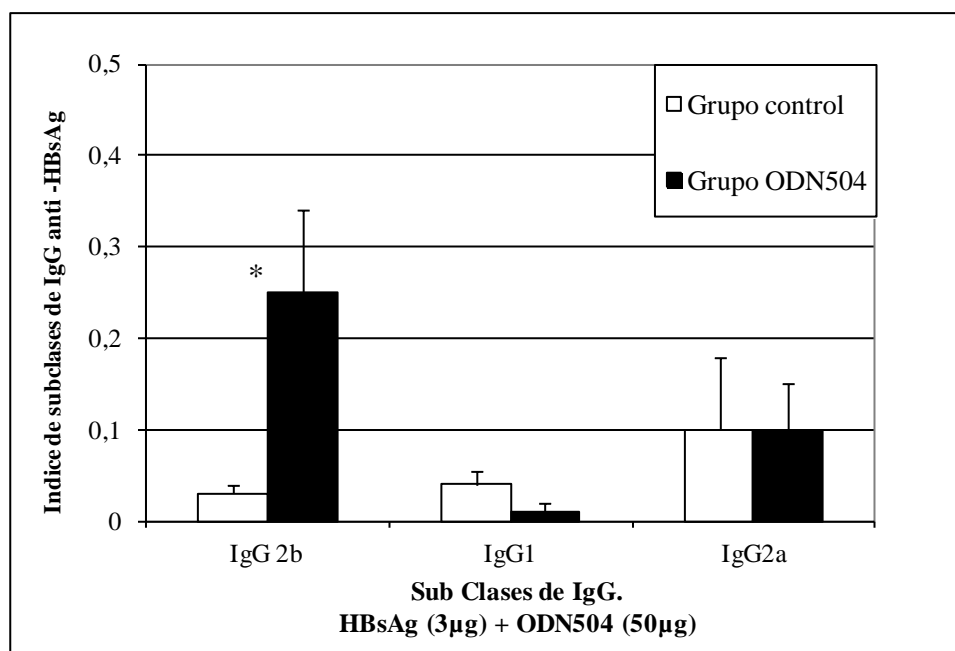
En el caso de una infección con el virus de hepatitis B la eliminación completa del virus requiere de una respuesta Th<sub>1</sub>. Sin embargo, la alúmina es un fuerte estimulante de la respuesta inmune Th<sub>2</sub> y en la actualidad es el único adyuvante aprobado para su aplicación en adultos y niños en las vacunas comerciales de Hepatitis B.

Con el ánimo de investigar el perfil de la respuesta T en presencia del adyuvante ODN 504, se determinó el título de diferentes subclases de IgG mediante la técnica ELISA. Además, en función de los resultados obtenidos anteriormente nos pareció oportuno evaluar el perfil de la respuesta en animales inmunizados con el ODN 504 en ausencia y en presencia de la alúmina.

Si bien en rata no existe una clara asociación entre la IgG<sub>2b</sub> y la respuesta Th<sub>1</sub>, algunos trabajos científicos describen cierta relación entre ellos (121, 122), sin embargo hasta el momento no está claro el compromiso del IFN- $\gamma$  en el switch de clase.

Los resultados fueron analizados en función del promedio de la relación de cada sub-clase con respecto a la IgG Total de cada animal. En el gráfico C8, se puede observar un predominio de la subclase IgG<sub>2b</sub> sobre el resto de las subclases analizadas cuando se inmunizó el antígeno junto al ODN 504 en ausencia de la alúmina.

**Gráfico C8. Índice de sub-clases de anticuerpo IgG en ratas inmunizadas con el antígeno HBsAg en ausencia o en presencia del ODN 504.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (20 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 3 $\mu$ g de HBsAg en ausencia (grupo control) o en presencia de 50 $\mu$ g de ODN 504 (grupo ODN 504) por animal. Cada barra representa el promedio del título de la subclase IgGx/IgGtotal específica anti HBsAg y el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

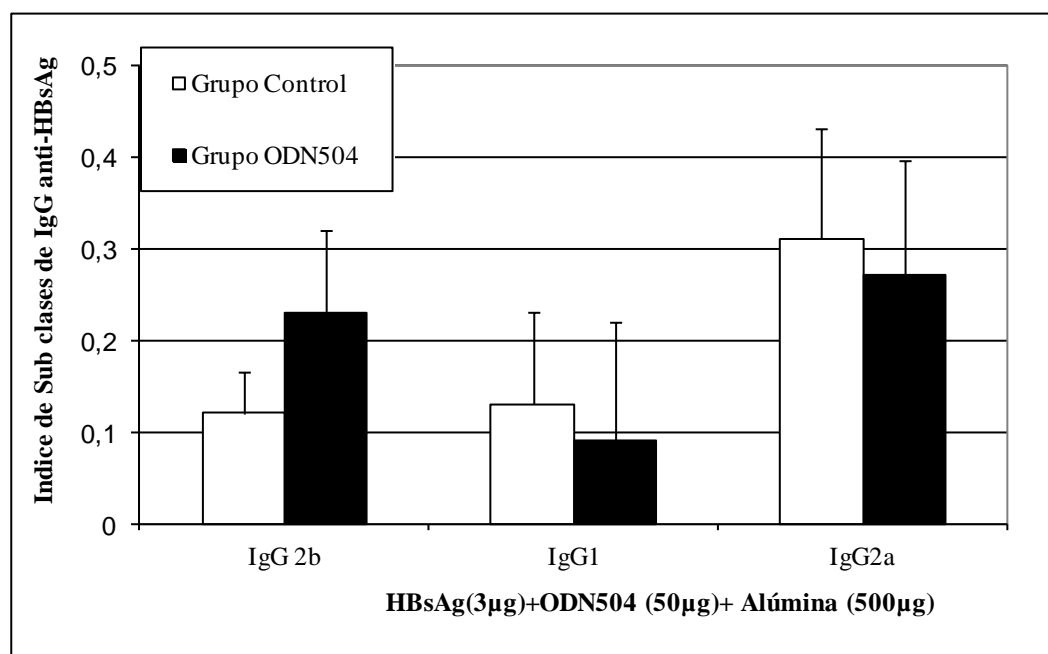
Estos resultados indican que el ODN 504 *per-se*, provoca un predominio de la respuesta sérica de anticuerpos de la sub-clase IgG<sub>2b</sub>.

Con el fin de evaluar el comportamiento del ODN 504 junto a la alúmina, se analizaron las diferentes sub-clases de IgG en animales inmunizados con el antígeno de HBsAg más 500 $\mu$ g de alúmina (alta concentración), en ausencia o presencia del ODN 504.



Como se puede observar en el gráfico C9, en presencia del ODN 504 se refleja un predominio o tendencia de la IgG<sub>2b</sub> sobre la IgG<sub>1</sub>. Por lo tanto, el agregado de la alúmina no modificó el perfil de sub-clase de IgG que establece el ODN 504.

**Gráfico C9. Índice de sub-clases de anticuerpo IgG en ratas inmunizadas con el antígeno HBsAg más 500µg de alúmina, en ausencia o en presencia del ODN 504.**

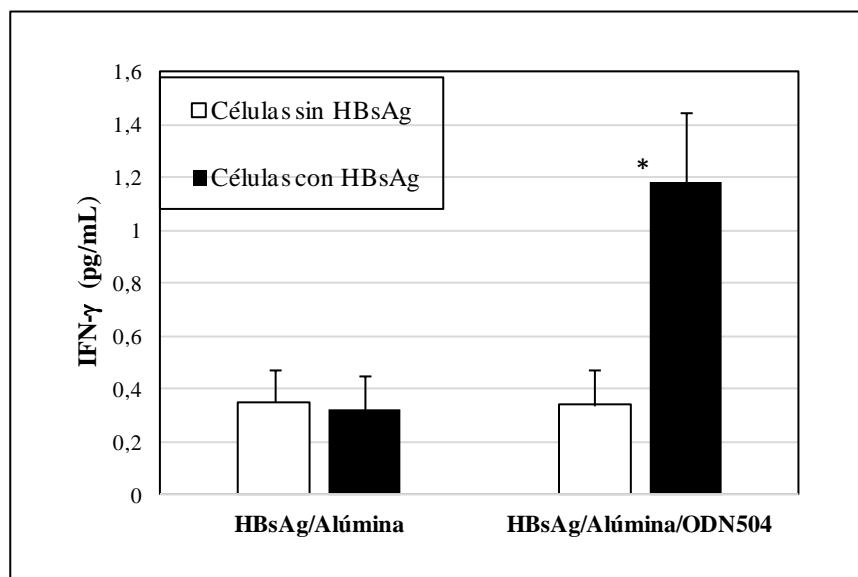


Ratas de la cepa Sprague-Dawley (20 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 3µg de HBsAg más 500µg de alúmina sin ODN, grupo control, o con el agregado de 50 µg de ODN 504 por animal, grupo ODN 504. Cada barra representa el promedio del título de la subclase IgG<sub>x</sub>/IgG<sub>total</sub> específica anti HBsAg y el desvío estándar.

Como mencionamos anteriormente, debido a que la asociación entre la IgG<sub>2b</sub> y la respuesta Th<sub>1</sub> en rata no está bien definido como si lo está en ratón, consideramos oportuno evaluar la presencia de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivos estimulados con el antígeno de HBsAg.

Para ello, se realizó un cultivo del bazo proveniente de animales que fueron inmunizados con los siguientes componentes: HBsAg/Alúmina (500µg) en ausencia (grupo control) o en presencia de 50µg del ODN 504 (grupo ODN 504). Al cabo de un mes post-inoculación se evaluó la concentración de IFN-γ luego de 48h de ser estimulados con el antígeno HBsAg, los resultados se muestran en el gráfico C10.

**Gráfico C10. IFN- $\gamma$  en sobrenadantes de cultivo de animales inmunizados con HBsAg/alúmina en ausencia o en presencia del ODN 504.**



Secreción de IFN  $\gamma$  (interferón gamma) en células del bazo (esplenocitos) de ratas inmunizadas con HBsAg/Alúmina en ausencia o en presencia del ODN 504, estimulados *in vitro* sin y con HBsAg. Cada una de las barras representa la media del grupo (n=6). Las barras blancas corresponden a células incubadas en ausencia de HBsAg y las barras negras a células incubadas en presencia de HBsAg. La determinación de IFN- $\gamma$  se realizó en sobrenadantes de cultivo estimulados luego de 48h. mediante la técnica ELISA de captura. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba t de Student con su respectivo grupo control.

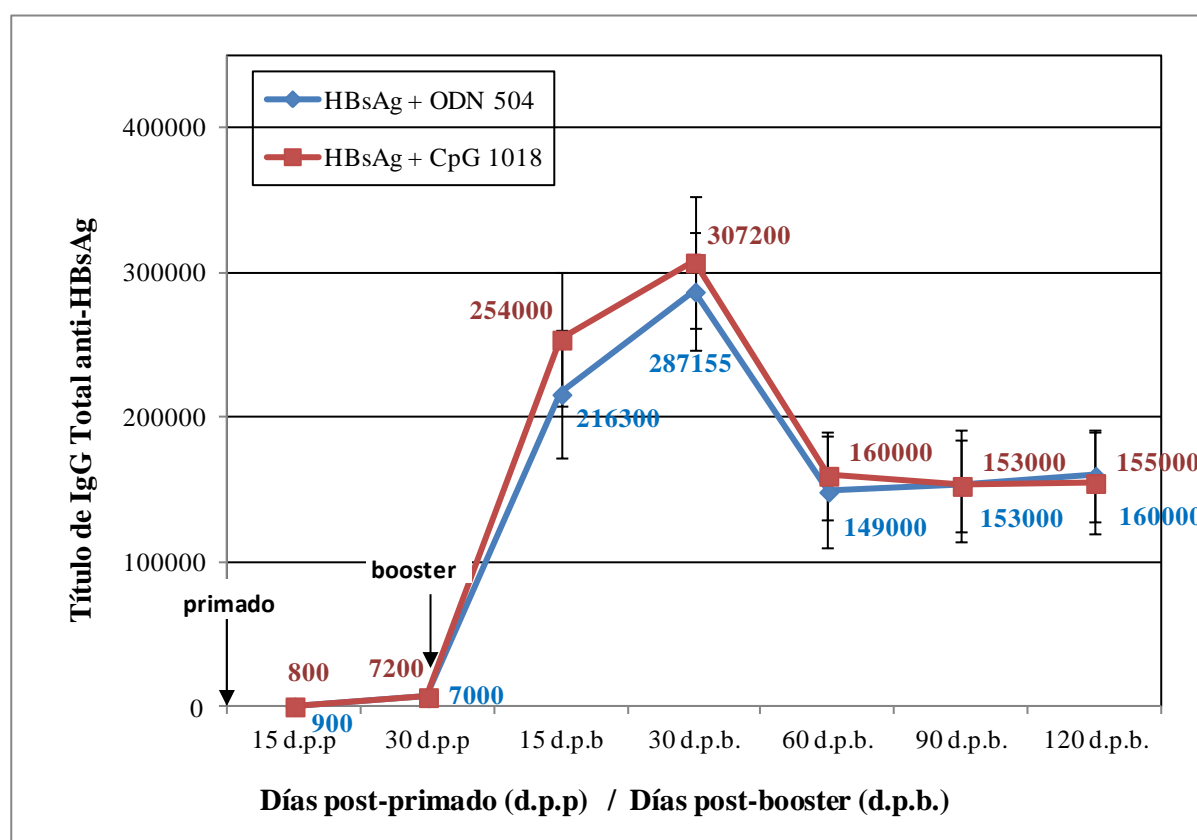
La producción de interferón  $\gamma$  fue significativamente superior en aquellos animales que recibieron además de la alúmina el ODN 504 como adyuvante, estos resultados indicarían que el ODN 504 mejora los componentes de la respuesta inmune del tipo Th<sub>1</sub>.

Hasta aquí, los estudios realizados en monos y en ratas indican que los efectos inmunoestimulantes observados *in vitro* de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* se reflejan *in vivo*.

En ratas, la acción adyuvante del ODN 504 se manifestó en ausencia o en presencia de alúmina, si bien la respuesta generada en ausencia de alúmina fue baja, en todos los casos, el esquema de inmunización consistió en la aplicación de una única dosis. Por lo tanto, resultó de interés evaluar la respuesta hacia el antígeno recombinante de hepatitis B (HBsAg) en un esquema de inmunización de dos dosis. En paralelo, también se evaluó la respuesta generada por el ODN 1018 ISS (ODN clase B/K) cuya secuencia contiene motivos CpG (5'TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA 3'), con el objetivo de comparar la actividad de ambos adyuvantes. La actividad adyuvante de este ODN CpG fue demostrada en diferentes estudios clínicos (fase I/II yIII) en individuos adultos junto al antígeno recombinante de Hepatitis B (123, 124,125).

En el siguiente gráfico C11, se puede observar que si bien el primado de la respuesta fue pobre para ambos oligonucleótidos testeados, la respuesta de anticuerpos IgG Total específica aumentó significativamente luego de la inoculación de la segunda dosis (booster).

**Figura C11. Comparación de la actividad adyuvante del ODN 504 e 1018 ISS junto al antígeno recombinante de HBsAg.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con 3µg de HBsAg más 50 µg de ODN 504 PS (HBsAg + 504) o CpG 1018 PS (HBsAg + 1018) al día 0 (primado). A los 30 días se administró una segunda dosis (booster) de igual formulación que el primado. A diferentes tiempos post-primado (d.p.p) o post-booster (d.p.b) se obtuvo suero y se determinó el título de IgG Total anti HBsAg mediante el método de ELISA. Las líneas ■ corresponden al grupo HBsAg + CpG1018 y las ■ al grupo HBsAg + ODN 504 ± el desvío estándar.

El nivel de respuesta generado luego de la primera dosis (primado) utilizando el oligonucleótido CpG 1018 o el ODN 504 fue bajo. Sin embargo, se encuentra en el orden de los resultados obtenidos previamente en ausencia de alúmina (8000-10000).

Luego del booster, el nivel de respuesta generado superó aproximadamente 4 (cuatro) veces a los valores obtenidos cuando se inmunizó con una única dosis del ODN 504 y 500µg de alúmina (287155 vs.71440).

Luego de 60 días de realizar el booster (60 d.p.b.) se puede observar una disminución de la respuesta sérica de anticuerpos específicos, tanto para el ODN CpG (1018) como para el no CpG (504). Hay que tener en cuenta que esta disminución esta representada por una dilución al medio.

Es sabido que la eficiencia de una vacuna requiere generalmente de la aplicación de más de una dosis. Por ejemplo, en la población pediátrica se necesitan hasta cinco dosis para completar el esquema de vacunación de la difteria y tétanos. Estas múltiples inmunizaciones se denominan “prime booster” o “prime booster” homólogo, debido a que se utiliza siempre la misma formulación de la vacuna en las distintas dosis.

En la última década, se demostró que las vacunas “prime booster” heterólogas, son más efectivas que las vacunas “prime booster” homólogas (92, 126), debido a que son mas inmunogénicas. El prime booster heterólogo consiste en inmunizar con el mismo antígeno en diferentes formulaciones, por ejemplo se utilizan diferentes adyuvantes en las distintas dosis.

Con el ánimo de determinar la actividad del ODN 504 en distintas dosis, se diseñó un ensayo de “prime booster heterólogo” en ratas Sprague-Dawley. Por otro lado, evaluamos la respuesta generada con la composición tradicional de la vacuna comercial de hepatitis B, en el cual se utiliza alúmina como un único adyuvante, a este diseño experimental lo denominamos “prime booster homólogo convencional”. También testearon una formulación en la cual se encuentran presentes ambos adyuvantes, modelo experimental al que denominamos “prime booster homólogo de doble adyuvancia”.

En el siguiente esquema se representan los diferentes diseños experimentales.

**“Prime booster heterólogo”**

Primado (primera inoculación):

- 1) HBsAg
- 2) HBsAg + ALOOH
- 3) HBsAg + ALOOH + ODN 504

Booster (segunda dosis):

HBsAg + ODN 504

**“Prime booster homólogo”**

4) HBsAg + ODN 504 → HBsAg + ODN 504

**“Prime booster homólogo convencional”**

5) HBsAg + ALOOH → HBsAg + ALOOH

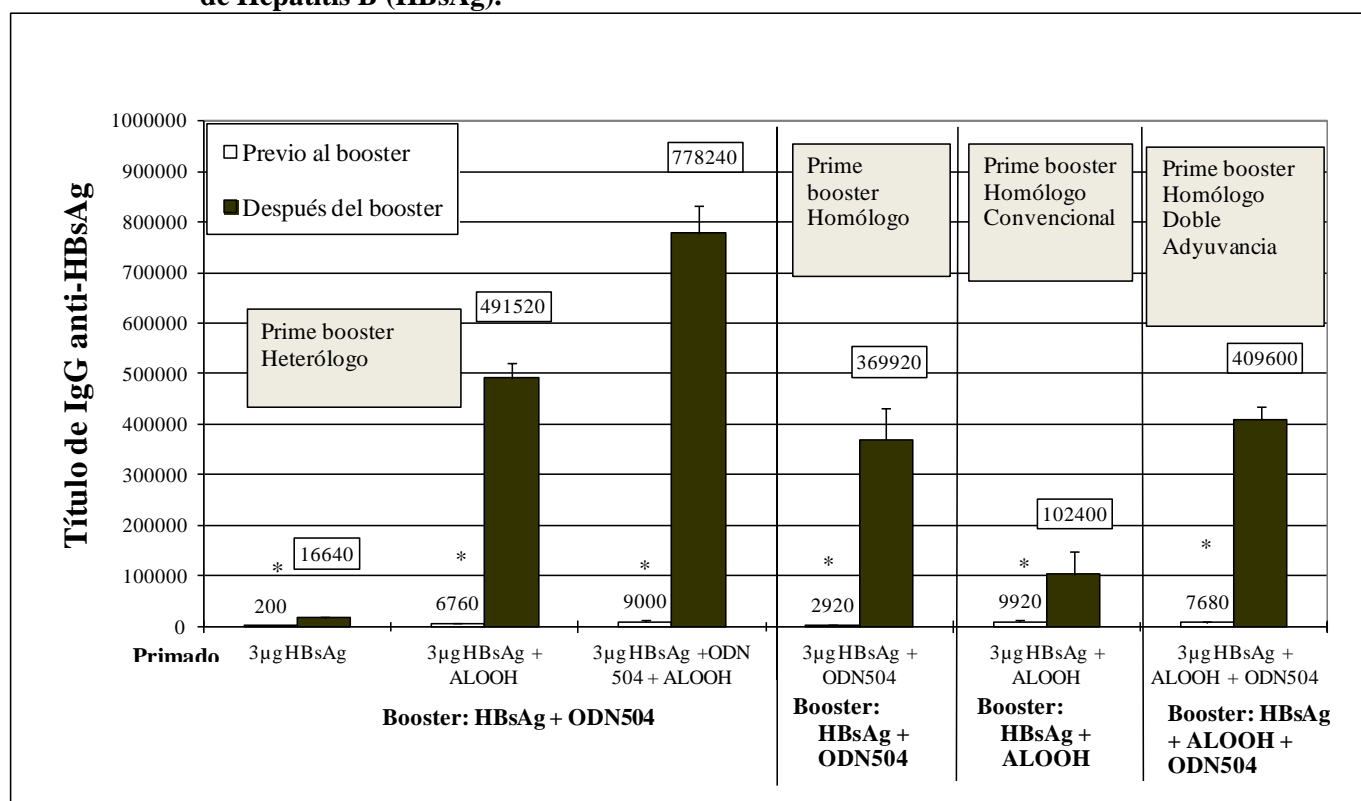
**“Prime booster homólogo de doble adyuvancia”**

6) HBsAg + ALOOH + ODN 504 → HBsAg + ALOOH + ODN 504

La respuesta de anticuerpos IgG total específica se evaluó en el suero de los animales inmunizados con las diferentes formulaciones a los 30 (treinta) días post inoculación del primado (previo al booster) y del booster (después del booster) mediante la técnica de ELISA.

Como se observa en el gráfico C12, en todos los casos la respuesta generada previa al booster, hacia el antígeno de HBsAg, fue pobre independientemente de la formulación antigénica. Los animales que recibieron solo el antígeno de HBsAg durante el primado, y un booster de HBsAg + ODN 504, presentaron un nivel de respuesta que se encuentra en el orden de una única dosis de la vacuna AgB<sup>®</sup> (16640 y 21760 respectivamente). Estos resultados fueron los más bajos de todo el protocolo, indicando que durante el primado es necesario el agregado de un adyuvante.

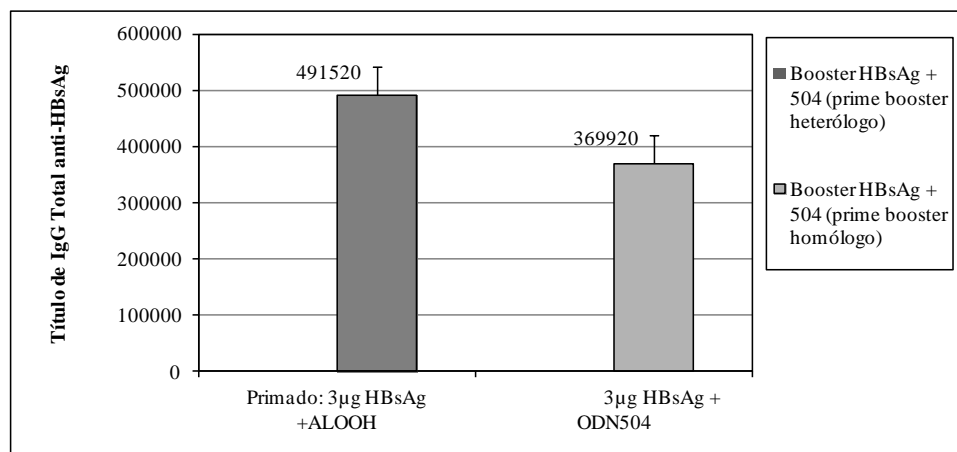
**Gráfico C12. Evaluación de la respuesta generada hacia diferentes formulaciones del antígeno de Hepatitis B (HBsAg).**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente al día 0 (primado) con 3µg. de HBsAg y/o 50µg del adyuvante ODN 504 y/o 75µg/dosis de alúmina (ALOOH). Luego de 30 días post-inoculación del primado se inocularon los animales con diferentes formulaciones del HBsAg (booster). Se obtuvieron muestras de suero a los 30 días post primado (Previo al booster □) y post booster (Después del booster ■) y se determinó el título de IgG total específica anti HBsAg. Cada barra representa el promedio del título de IgG Total en cada grupo experimental ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

Cuando comparamos los grupos experimentales que durante el primado recibieron el HBsAg + ALOOH (prime booster heterólogo) o el HBsAg + ODN 504 (prime booster homólogo) y luego el mismo booster de HBsAg + ODN 504, se puede observar que los niveles de respuesta se encuentran en el mismo orden (491520 vs 369920), gráfico C13.

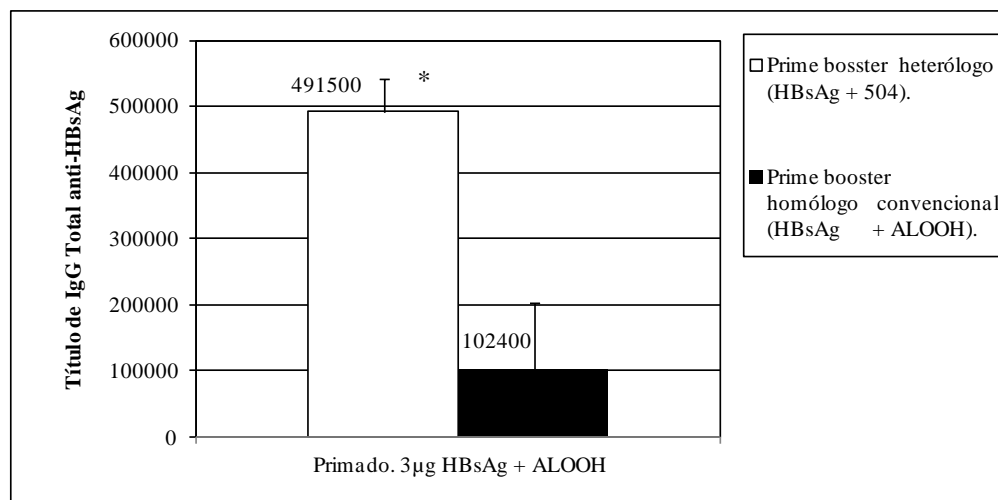
**Gráfico C13. Comparación prime booster heterólogo vs homólogo, utilizando diferentes primados y el mismo booster.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas durante el primado (día 0) intramuscularmente con 3µg. de HBsAg más 75µg. (3µg HBsAg + ALOOH, prime booster heterólogo) o 50µg del ODN 504 (3µg HBsAg + ODN 504, prime booster homólogo). Luego de 30 días post-inoculación todos los animales recibieron un booster con el antígeno HBsAg + ODN 504. Cada barra representa el promedio del título de IgG Total anti HBsAg en cada grupo experimental + el desvío estándar.

Sin embargo, cuando comparamos los dos grupos que fueron primados en presencia de alúmina (HBsAg + ALOOH) y se varió la naturaleza del booster, encontramos que la mejor condición la presentaron los animales que recibieron el ODN 504 (prime booster heterólogo) en comparación con los que recibieron ALOOH (prime booster homólogo convencional), gráfico C14.

**Figura C14. Comparación prime booster heterólogo vs homólogo, utilizando el mismo primado con diferentes booster.**

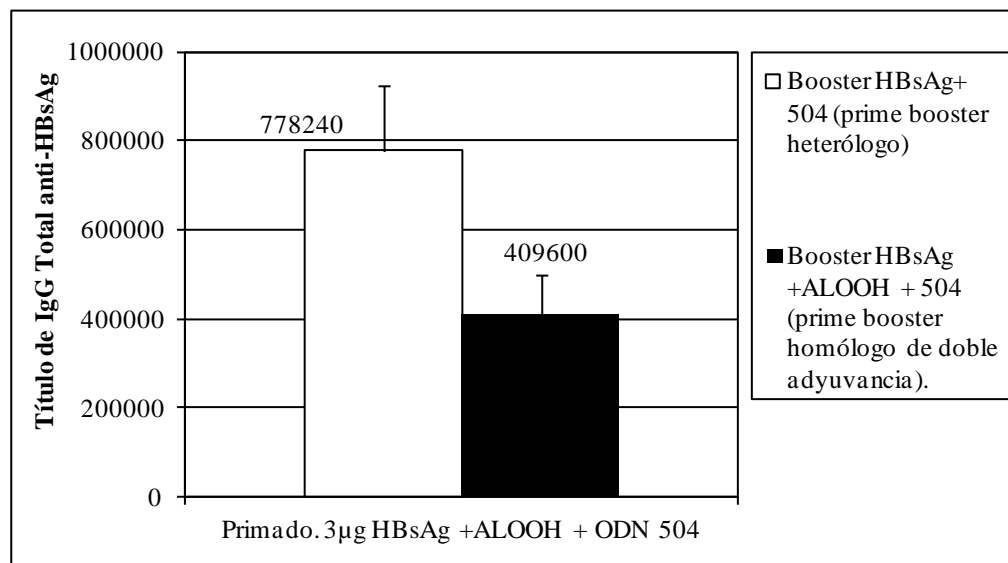


Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas durante el primado (día 0) intramuscularmente con 3 µg de HBsAg más 75 µg (3 µg HBsAg + ALOOH). Luego de 30 días post-inoculación todos los animales recibieron un booster con el antígeno HBsAg + ODN 504 (prime booster heterólogo) o con HBsAg + ALOOH (prime booster homólogo convencional). Cada barra representa el promedio del título de IgG Total anti HBsAg en cada grupo experimental  $\pm$  el desvío estándar. El asterisco (\*) indican la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum.

Este resultado nos estaría indicando que un booster en presencia del oligonucleótido mejora la respuesta con respecto a la obtenida cuando se utiliza la alúmina en ambas dosis con la “formulación convencional” (491520 vs 102400  $p < 0.05$ ).

El grupo de animales que recibió durante el primado ambos adyuvantes y, solo el oligonucleótido durante el booster presentó los niveles de anticuerpos más elevados de todo el protocolo (~778.240). Este resultado comparado con el obtenido cuando se emplearon ambos adyuvantes en las dos dosis (prime booster homólogo de doble adyuvancia), indicaría que el agregado de alúmina durante el booster no mejora los niveles de anticuerpos específicos en suero. Además, si bien la diferencia no es significativa, el nivel de respuesta generada luego de un booster conteniendo sólo el ODN 504 es ligeramente superior (778.240 vs. 409.600), gráfico C15.

**Gráfico C15. Comparación prime booster heterólogo vs homólogo de doble adyuvancia, utilizando el mismo primado con diferentes booster.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizados durante el primado (día 0) intramuscularmente con 3µg. de HBsAg más 75µg. de ALOOH y 50µg de ODN 504 (3µg HBsAg + ALOOH + ODN 504). Luego de 30 días post-inoculación un grupo de animales recibió un booster de HBsAg + 504 (prime booster heterólogo) y otro grupo de animales recibió HBsAg + ALOOH + 504 (prime booster homólogo). Cada barra representa el promedio del título de IgG Total anti HBsAg en cada grupo experimental + el desvío estándar.

Nuestros resultados indican que el esquema de administración de la vacuna de Hepatitis B, en el cual se utiliza al antígeno HBsAg adsorbido a la alúmina como adyuvante (formulación tradicional o convencional) genera una respuesta que claramente puede ser favorecida si se reemplaza la alúmina por el oligonucleótido como adyuvante en la segunda dosis.



## Capítulo D.

### Evaluación del ODN 504 como adyuvante de la vacuna contra la Hepatitis A.

La hepatitis A es una infección producida por un virus ARN (VHA) que se trasmite por la ingestión de agua o alimentos contaminados con heces de individuos infectados. La distribución es mundial, pero se pueden identificar zonas con endemidad elevada, intermedia y baja (127).

La prevención de la hepatitis A consiste en llevar a cabo un esquema de vacunación de tres dosis: 0, 1 y 6-12 meses en niños y de dos dosis en adultos (128). Teniendo en cuenta la tasa de incidencia de algunos países a partir del año 2005 se modificó el número de dosis. Por ejemplo, en nuestro país como estrategia de vacunación se utiliza una sola dosis de vacuna inactivada en niños (129). Sin embargo, hay que tener en cuenta que siguiendo un calendario de vacuna de dos dosis, la vacuna induce memoria inmunológica a largo plazo, aproximadamente durante 20 años (en el 87% de los individuos vacunados) (130, 131, 132).

Las vacunas comerciales actualmente son: Havrix (Glaxosmithkline), Avaxin (Sanofi-Pasteur) y Vaqta (Merck Sharp & Dohme B.V) que contienen hidróxido de aluminio como adyuvante. La vacuna Epaxal-Virohep elaborada por el Instituto Suizo Berna-Biotech ha sido desarrollada con la estrategia de vehicular el VHA en la superficie de virosomas.

Si bien la mayor evaluación de la inmunogenicidad se ha desarrollado con dosis múltiples de estas vacunas, la búsqueda de reducción en el número de dosis sin sacrificar la intensidad y frecuencia de la protección es objeto de investigación. Además, la producción del antígeno de VHA para elaborar las vacunas es limitado debido al alto costo de procesamiento de los cultivos celulares, por lo tanto la búsqueda de nuevos adyuvantes con el objetivo de reducir la masa de antígeno de VHA en la fabricación de las vacunas comerciales también es objeto de estudio en la actualidad.

La actividad adyuvante del ODN 504 (prototipo *PyNTTTTGT*) fue evaluada junto a la vacuna inactivada anti-hepatitis A Havrix<sup>®</sup>, la cual es una suspensión estéril que contiene el virus de la Hepatitis A (720 UEL cepa A HM175) inactivado y adsorbido en hidróxido de aluminio como adyuvante.

**Inmunización en monos con la vacuna de Hepatitis A Havrix.**

El diseño experimental consistió en inmunizar 12 (doce) primates de la especie *Cebus apella*. Se conformaron 2 (dos) grupos experimentales de 6 (seis) animales cada uno. Previo al comienzo del estudio, se tomó una muestra de sangre de cada uno de los animales para verificar que no presentaran título de anticuerpos anti-VHA, este valor se consideró como basal. Todos los animales fueron inoculados con una dosis de 360 U Elisa de la vacuna Havrix (dosis pediátrica) por vía intramuscular. El grupo VHA/ALOOH recibió solamente la vacuna. El grupo VHA/ALOOH + ODN 504 correspondió a animales que recibieron la vacuna en combinación con una dosis de 300µg del ODN 504, en esta oportunidad la dosis del oligonucleótido utilizado como adyuvante fue el doble de la dosis utilizada en el protocolo de la vacuna de Hepatitis B (AgB<sup>®</sup>) en estos animales. Ambos grupos de animales fueron inoculados con una dosis de la vacuna con o sin el agregado del ODN 504 al día cero y se realizaron extracciones de sangre en las semanas 2 (dos) y 4 (cuatro) post-inoculación.

En función de los resultados obtenidos en la semana 2, tabla D 1, donde se observó una muy baja producción de anticuerpos en ambos grupos, se decidió completar el esquema de vacunación realizando una segunda dosis o booster, igual a la primera en la semana 4 (cuatro). Luego de esta fecha se extrajo sangre en las semanas 6 (seis) y 8 (ocho).

Se determinó el título sérico de IgG anti VHA (UI/ml) utilizando un ELISA cuantitativo de Abbott (HAVAB/MEIA, Abbott Laboratorios, Abbott ParK). Se consideró como sueros reactivos a valores de títulos  $\geq 50$ UI/mL donde no hay posibilidad de interferencia.

**Tabla D1. Evaluación de la respuesta generada por el ODN 504 junto a la vacuna de Hepatitis A (Havrix®) en monos *Cebus apella*.**

Grupo	Anticuerpor anti IgG VHA (UI/mL)				
	Basal (1 <sup>era</sup> dosis)	Semana 2	Semana 4 (2 <sup>da</sup> dosis)	Semana 6	Semana 8
Grupo 1 "VHA/ALOOH"	12,64	13,38	14,01	<b>50,96</b>	<b>72,87</b>
	1,83	7,93	1,14	13,57	<b>57,61</b>
	4,33	9,01	13,44	39,5	<b>80,64</b>
	13,78	16,57	49,13	<b>75,89</b>	<b>88,69</b>
	2,5	14,45	43,81	<b>86,74</b>	<b>92,49</b>
	11,71	10,82	9,55	11,44	35,97
Grupo 2 "VHA/ALOOH + ODN 504"	9,39	32,44	22,92	<b>58,96</b>	<b>62,38</b>
	3,28	16,73	31,03	<b>68,39</b>	<b>82,78</b>
	7,51	16,18	28,6	<b>58,91</b>	<b>64,74</b>
	9,61	11,3	32,18	<b>80,47</b>	<b>87,55</b>
	8,25	23,31	38,64	<b>76,29</b>	<b>82,65</b>
	11,72	33,27	<b>62,79</b>	<b>85,14</b>	<b>86,31</b>

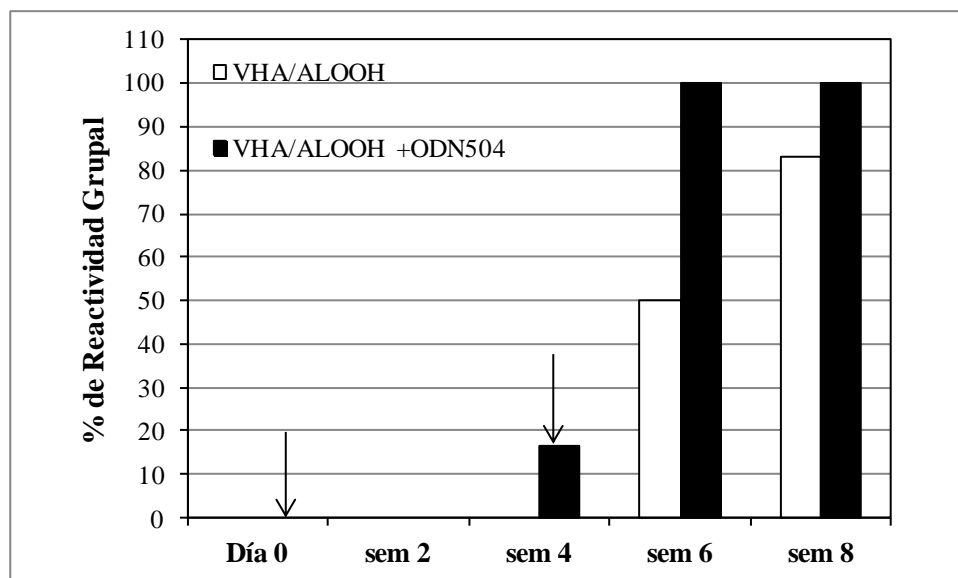
Título de anticuerpos en *C. apella* inmunizados intramuscularmente con dos dosis de la vacuna HAVRIX (Glaxosmithkline) 360 U Elisa (UEI, dosis pediátrica) en alúmina Grupo 1 (VHA/ALOOH) o con el agregado de 300µg de ODN 504 Grupo2 (VHA /ALOOH + ODN 504). Las inmunizaciones se realizaron al día 0 y en la semana 4 (2<sup>da</sup> dosis o booster). Previo a la inoculación el día 0 se extrajo una muestra de sangre y se determino el título de anticuerpos (Basal). Los anticuerpos anti VHA fueron determinados por el método de Abbott (Ausab EIA, Abbott Laboratorios, Abbott ParK) y se expresan en UI/mL. Títulos  $\geq 50$ UI/mL en negrita.

Si analizamos el porcentaje de reactividad grupal (animales con títulos de anticuerpos  $\geq 50$ UI/mL), se puede observar un aumento de reactividad creciente en el grupo que recibió el adyuvante ODN 504 a partir de la semana 4 hasta la semana 6, gráfico D1.

En la semana 6, luego de dos semanas de recibir el booster (segunda dosis), el grupo de animales que recibió el adyuvante (VHA/ALOOH+ODN 504) presentó un 100% de reactividad comparado a un 50% del grupo control (VHA/ALOOH). Esta diferencia disminuye hacia la semana 8, debido a que en el grupo control un animal presentó título de anticuerpos menor a 50UI/mL, lo que representa un 17% del total de animales inmunizados. Además, en la semana 8 los valores promedio entre ambos grupos son similares, indicando que luego del booster, un mes es suficiente para que la mayoría de los animales se encuentren con valores  $\geq 50$ UI/mL.

La acción del ODN 504 junto a la vacuna anti VHA ayudaría a alcanzar niveles de protección en un período de tiempo más corto que la vacuna tradicional, lo cual podría ser beneficioso frente a un posible brote epidemiológico.

**Gráfico D1: Porcentaje de reactividad en monos *Cebus apella* inmunizados con la vacuna de Hepatitis A (Havrix) en ausencia y en presencia del ODN 504.**



Porcentaje de reactividad Grupal ( $\geq 50$  UI/mL) en monos *C. apella* inmunizados intramuscularmente con dos dosis de la vacuna Havrix<sup>®</sup> 360 U Elisa (UEI/dosis pediátrica) en alúmina Grupo 1 (VHA/ALOOH) o con el agregado de 300 $\mu$ g de ODN 504 Grupo 2 (VHA/ALOOH + ODN 504). Las inmunizaciones se realizaron al día 0 y en la semana 4 (booster) indicado con flechas negras. Los anticuerpos anti VHA fueron determinados por el método de Abbott (Ausab EIA, Abbott Laboratorios, Abbott ParK).

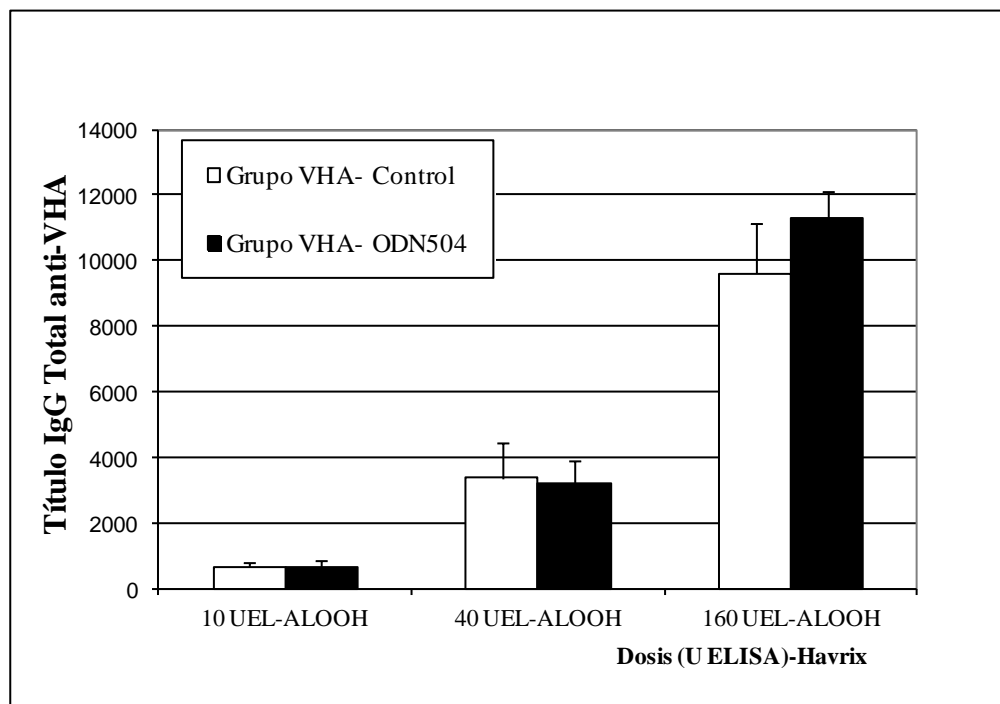
Con el objetivo de obtener resultados *in vivo* estadísticamente significativos se testeó la vacuna Havrix<sup>®</sup> en ratas de Sprague-Dawley.

### **Inmunización en ratas Sprague-Dawley con la vacuna de Hepatitis A Havrix<sup>®</sup>.**

En este estudio se evaluaron tres dosis diferentes de la vacuna comercial de Hepatitis A Havrix<sup>®</sup>: 10, 40 y 160 U.EL. (Unidades de ELISA) por dosis, solas o combinadas con 50 $\mu$ g del ODN 504. La vía de administración fué intramuscular, realizándose determinaciones del título de anticuerpos anti VHA a los 30 días post-inmunización.

Se observó una respuesta dosis dependiente en las 3 (tres) dosis estudiadas, sin embargo no se observaron diferencias entre los animales controles (sin el ODN 504) y los animales que recibieron el ODN 504 en ninguno de los grupos inmunizados, gráfico D2.

**Gráfico D2. Evaluación de la actividad del ODN 504 junto a la vacuna comercial anti Hepatitis A Havrix® en ratas Sprague-Dawley.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes dosis (10-40 y 160 UEL (Unidades de ELISA) de la vacuna comercial anti Hepatitis A Havrix® en ausencia (Grupo VHA-Control) o en presencia de 50µg de ODN 504 PS (Grupo VHA-ODN 504). Luego de 30 días post-inoculación se determinó el título de anticuerpos IgG en el suero de todos los animales. Cada barra representa el promedio del título de IgG Total anti VHA de cada grupo. El título de anticuerpos IgG Total anti VHA fue determinado por el método de ELISA.

Estos resultados indican que el ODN 504 administrado conjuntamente con la vacuna comercial Havrix® no posee efecto adyuvante en ratas Sprague-Dawley.

La vacuna Havrix se encuentra formulada en hidróxido de aluminio. Esta vacuna contiene la misma masa de alúmina por dosis que la vacuna comercial de Hepatitis B AgB® (Laboratorio Pablo Cassará). Si vinculamos ambos resultados podemos observar que cuando testeamos la vacuna comercial AgB® en ratas Sprague-Dawley, tampoco se manifestó el efecto adyuvante del ODN 504, solo se reflejó el efecto adyuvante del ODN 504 con la vacuna AgB® a bajas dosis de antígeno, donde con el objetivo de mantener constante la masa de alúmina se le agregó alúmina extra a estas dosis.

En esta oportunidad a ninguna de las dosis testeadas con la vacuna Havrix® se les agregó alúmina, de manera que independientemente de la masa de antígeno, todas las dosis evaluadas en ratas Sprague-Dawley contenían la misma relación de antígeno-alúmina que la presente en la vacuna comercial.

Estos resultados nos conducen una vez más, a pensar que la concentración de alúmina presente en las vacunas comerciales no permite reflejar el efecto adyuvante del ODN 504. Debe tenerse en cuenta que

al no contar con el antígeno purificado de Hepatitis A, no se pudo evaluar la actividad del oligonucleótido 504 combinado con una mayor cantidad de alúmina.

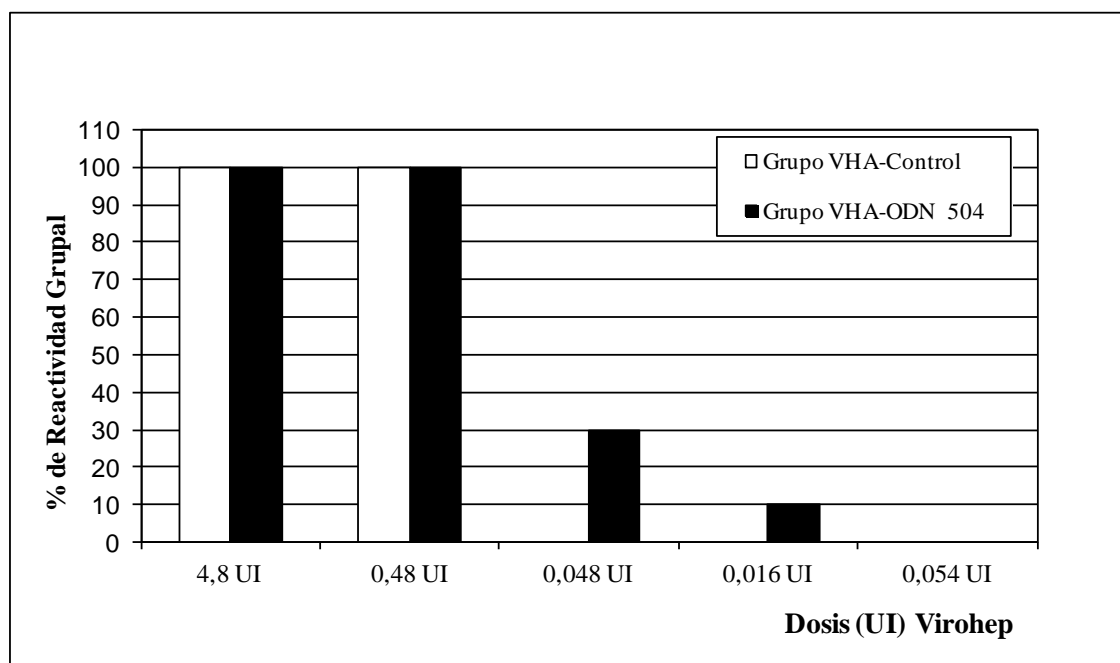
En función de los resultados obtenidos con la vacuna Havrix<sup>®</sup>, se decidió evaluar la respuesta inmunológica con una formulación diferente del antígeno de Hepatitis A.

### **Inmunización en ratas Sprague-Dawley con la vacuna de Hepatitis A Viroosomal. Virohep-A<sup>®</sup> Berna.**

La vacuna comercial Virohep-A<sup>®</sup> no contiene hidróxido de aluminio como adyuvante, en reemplazo de este adyuvante posee Hemaglutinina del virus de Influenza. La dosis vacunante en humanos es de 24UI (Unidades Internacionales) de antígeno del virus de la hepatitis A.

En las ratas Sprague-Dawley se evaluaron las siguientes dosis: 4.8; 0.48; 0.048; 0.016 y 0.0054UI del antígeno del virus de hepatitis A, con o sin el agregado de 50µg del ODN 504/dosis/animal. La vía de inoculación fue intramuscular y se realizaron determinaciones de la reactividad de los sueros obtenidos a los 30 días post-inmunización mediante el método de HAVAb-IgG (ARCHITECT<sup>®</sup> SYSTEM). El ARCHITEST HAVAb-IgG es un método de detección cualitativo del anticuerpo IgG frente al virus de la Hepatitis A (IgG anti VHA o HAV de sus siglas en inglés hepatitis A virus). Por esta metodología, los anticuerpos presentes en las muestras reconocen específicamente a la glicoproteína del virus de Hepatitis A y se calculan los valores de S/CO (signal-to cut-off: relación entre la señal que produce la muestra y el valor de corte para el método).

Los resultados se expresan como: sueros reactivos, aquellos sueros que reconocen a la glicoproteína viral y sueros no reactivos como aquellos sueros que no reconocen a la glicoproteína viral. Los datos fueron analizados en forma grupal y se representaron los porcentajes de reactividad de cada grupo experimental, gráfico D3. Se consideraron muestras reactivas a aquellas que presentaron una lectura respecto al punto de corte  $S/CO \geq 1.1$ .

**Gráfico D3. Evaluación actividad del ODN 504 junto a la vacuna comercial anti Hepatitis A Virohep-A®.**

Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes dosis de la vacuna comercial anti Hepatitis Virohep (Berna) en ausencia (Grupo VHA-Control) o en presencia de 50µg de ODN 504 PS (Grupo VHA-ODN 504). Luego de 30 días post-inoculación se obtuvo el suero de todos los animales. Los anticuerpos anti VHA (HAV) fueron determinados por el método de HAV Ab-IgG ARCHITECT® SYSTEM. Cada barra representa el porcentaje de reactividad de cada grupo experimental.

El análisis de los datos permitió demostrar que en las dosis de 4.8 UI y 0.48 UI, el % de reactividad de los sueros con o sin el ODN 504 fue el mismo, 100% de reactividad. Los grupos que presentaron diferencias en cuanto al porcentaje de reactividad corresponden a las dosis de antígeno de 0.048UI y 0.0016UI, donde solo fueron reactivas muestras de suero que recibieron la vacuna comercial más el ODN 504.

Hay que tener en cuenta que el porcentaje de reactividad observado en la dosis de 0.016UI fue muy bajo (10%), lo que corresponde a un suero reactivo de un total de 10 animales. El porcentaje de reactividad del grupo que recibió 0.048UI más el ODN 504 también fue bajo (30%) y en la dosis de 0.054 UI ningún suero presentó reactividad.

Entre las dosis testeadas de 0.48 y 0.048 UI se puede observar un 100 y 30% de reactividad respectivamente en presencia del adyuvante. Teniendo en cuenta que la disminución del antígeno es un factor importante a tener en cuenta en la fabricación de las vacuna contra la hepatitis A, sería importante evaluar en futuros ensayos la respuesta generada en dosis intermedias entre 0.048 y 0.48UI.

**Capítulo E.****Evaluación de la acción del ODN 504 junto a la vacuna comercial de la rabia, VeroRab<sup>®</sup>.**

El virus de la rabia es un virus ARN (simple cadena negativa) perteneciente al género *Lyssavirus*, este virus causa encefalitis en humanos (133, 134).

El número de muertes anuales por el virus de la rabia es importante (40000-70000) (135). Los países más afectados son aquellos en vías de desarrollo donde existe un alto grado de áreas endémicas (África o Asia) (136).

La importancia de la rabia para la Salud Pública tanto en Argentina como en el mundo no radica en el número de casos humanos (relativamente reducido), sino en el alto porcentaje de letalidad (100%) que alcanza la enfermedad (137), pues pese a los avances tecnológicos aún no se cuenta con tratamientos exitosos cuando el paciente ya presenta los síntomas.

En la actualidad los casos fatales que ocurren en el hombre a causa del virus rábico se deben a que no recibieron un tratamiento antirrábico oportuno, ni en tiempo ni en forma. Teniendo en cuenta los datos de mortalidad en el mundo, puede observarse que las muertes por rabia ocurren en países que presentan una clara deficiencia en el sistema de salud (138), el cual se refleja en una pobre vigilancia epidemiológica para el control de la rabia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda 3 (tres) dosis a los 0,7 y 21 o 28 días y un refuerzo anual en áreas donde el virus de la rabia es endémico (95). Sin embargo, actualmente se evidencia una clara falla en la implementación correcta de los programas de vacunación, fundamentalmente debido al elevado costo que presenta la vacuna. Por lo tanto, encontrar una vacuna que sea efectiva con una menor masa de antígeno y que además no requiera un extenso esquema de inmunización sería de gran utilidad. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la acción del ODN 504 junto a la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur).



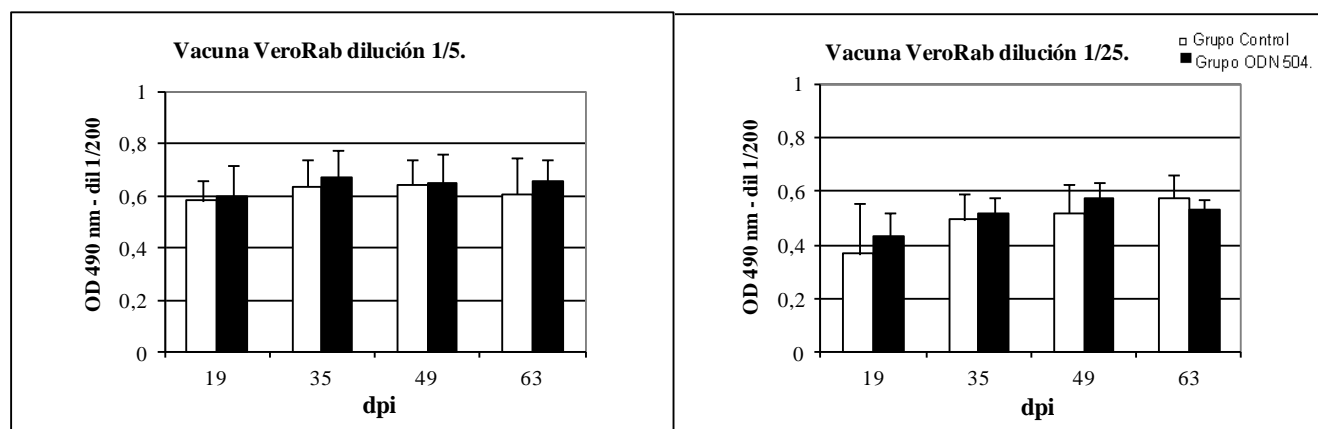
## Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup>, en ratas de la especie Sprague-Dawley.

Para este estudio se empleó la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur S.A.). Una dosis vacunante corresponde a un poder protector superior o igual a 2.5UI conforme a las recomendaciones de la OMS.

En el presente protocolo se inmunizaron 40 (cuarenta) ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con diferentes dosis de la vacuna comercial. Debido a que la vacuna VeroRab<sup>®</sup> no contiene una cantidad definida de unidades sino que su especificación indica que debe tener cantidades iguales o mayores a 2.5 UI protectoras, nos vimos obligados a expresar las diferentes dosis como diluciones y no como UI.

Los animales fueron inoculados intramuscularmente con las siguientes diluciones de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> 1/5, 1/25, 1/125 y 1/625 en ausencia (grupo control) o en presencia de 50µg/dosis del oligonucleótido 504 (grupo ODN 504). Las diferentes diluciones de la vacuna se mezclaron por pipeteo con el ODN 504. De manera que cada animal recibió la vacuna más el adyuvante al mismo tiempo. Con el objetivo de evaluar la cinética de la respuesta se obtuvieron muestras de sangre de cada animal a diferentes días post-inoculación (d.p.i) (19, 35; 49 y 63). La respuesta de anticuerpos de clase IgG se determinó mediante la técnica ELISA en cada uno de los sueros obtenidos, en una única dilución (1:200). Como se observa en el gráfico E1, durante todo el período de estudio se encontraron valores similares de O.D. en el análisis de las dosis 1/5 y 1/25 entre los animales controles y los que recibieron el ODN 504 como adyuvante.

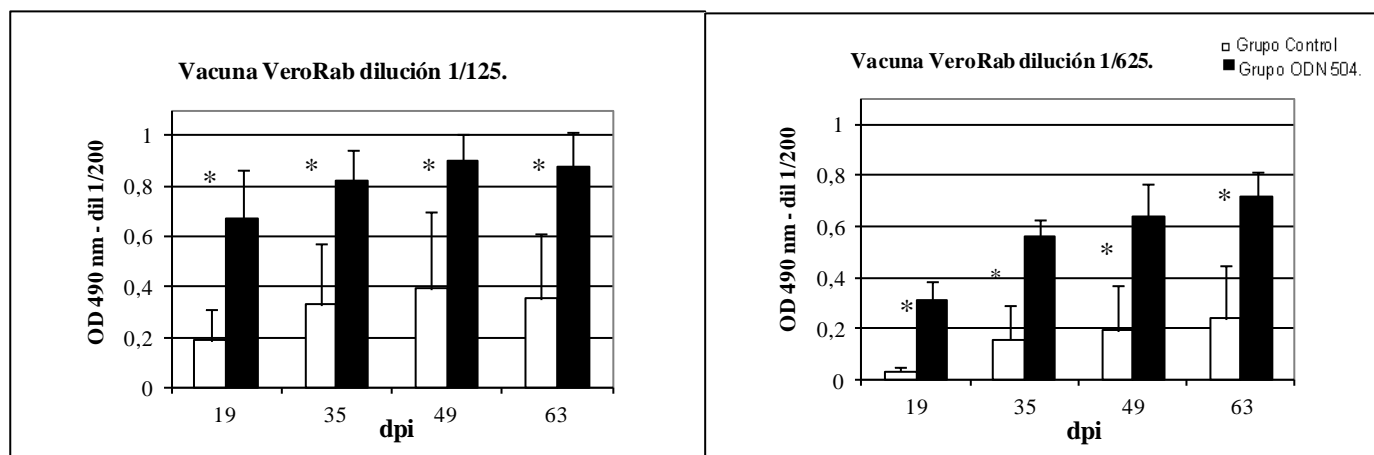
**Gráfico E1: Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 en las diluciones 1/5 y 1/25 de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ratas de la cepa Sprague-Dawley.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con las diluciones 1/5 y 1/25 de la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50 µg. de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de la O.D. a 490 nm en la dilución 1/200 + el desvío estándar, obtenido en un ELISA para cuantificar IgG Total específica anti el virus de la rabia en suero, Los datos provienen de tres experimentos independientes. Diferentes días post-inmunización (d.p.i.).

Sin embargo, resultados diferentes se encontraron cuando se utilizaron dosis más diluidas de la vacuna VeroRab<sup>®</sup>, gráfico E2

**Gráfico E2. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 en las diluciones 1/125 y 1/625 de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ratas de la cepa Sprague-Dawley.**

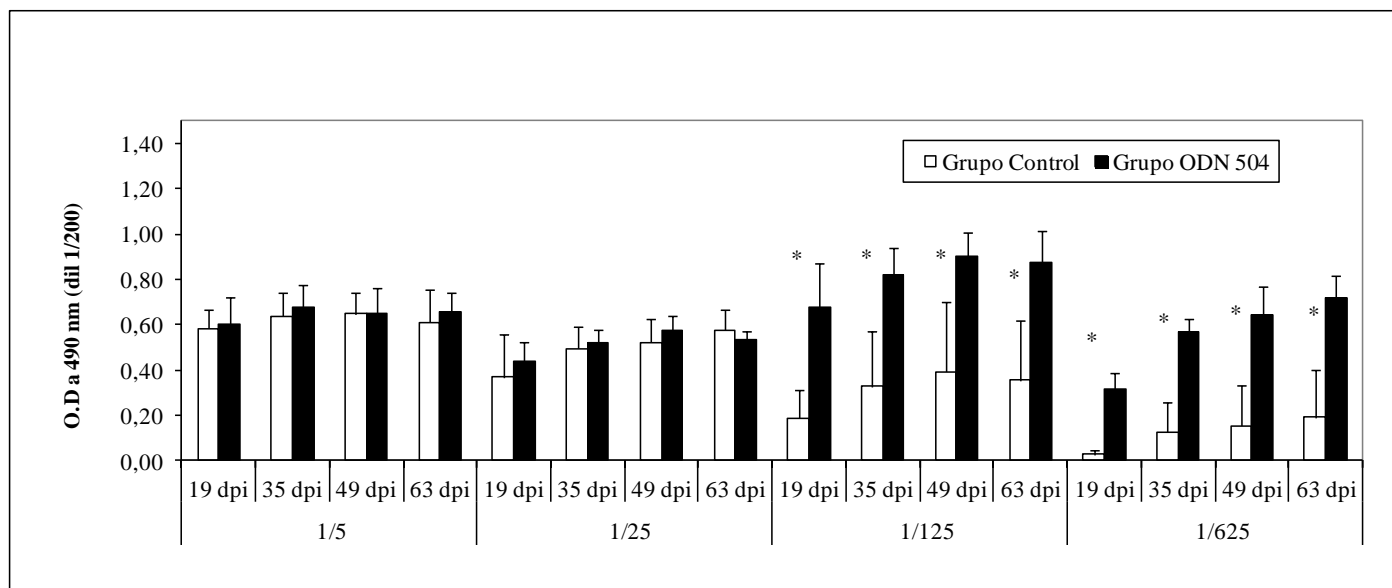


Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con las diluciones 1/125 y 1/625 de la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50 µg de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de la O.D. a 490 nm en la dilución 1/200 + el desvío estándar, obtenido en un ELISA para cuantificar IgG Total específica anti el virus de la rabia en suero. Los datos provienen de tres experimentos independientes. Diferentes días post-inmunización (d.p.i.). El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

En estas dosis se puede observar un aumento de la respuesta IgG Total en los animales que recibieron el ODN 504 durante todo el tiempo de estudio. En los grupos controles si bien se observa un lento y progresivo aumento de la respuesta, estos valores solo representan entre un 25 y 40% de la respuesta generada por los grupos que recibieron el adyuvante ODN 504.

Tomando en conjunto todos los resultados, gráfico E3, se puede concluir que en las dosis más bajas testeadas de la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (1/125 y 1/625) se manifestó el efecto adyuvante del ODN 504, siendo las dosis 1/5 y 1/25 dosis suficientes de antígeno, para generar una buena respuesta sin la necesidad de utilizar un adyuvante, motivo por el cual el ODN 504 no ejerce su acción adyuvante en estas dosis. Además, fue en la dosis 1/125 en presencia del adyuvante donde se encontraron los valores máximos de la respuesta de todo el protocolo.

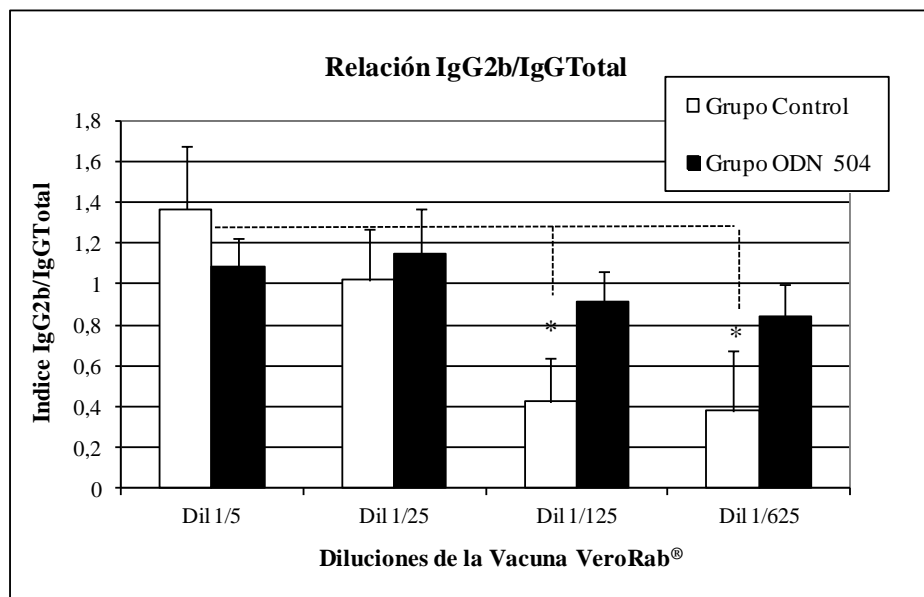
**Gráfico E3. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 con la vacuna comercial VeroRab® en ratas de la cepa Sprague-Dawley en función del tiempo.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes diluciones (1/5; 1/25; 1/125 y 1/625) de la vacuna comercial de la rabia VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50 µg de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de la O.D. a 490 nm en la dilución 1/200 + el desvío estándar, obtenido en un ELISA para cuantificar IgG Total específica anti el virus de la rabia en suero. Los datos provienen de tres experimentos independientes. Diferentes días post-inmunización (d.p.i.). El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

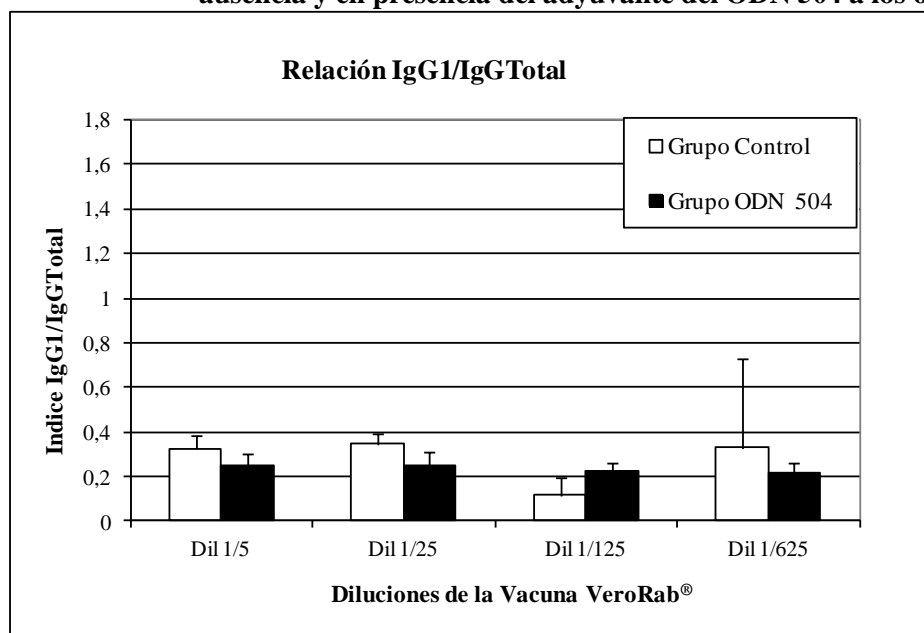
Con el objetivo de determinar el perfil de la respuesta T de los animales inmunizados en ausencia y en presencia del adyuvante, se determinó los valores de absorbancia a 490nm mediante la técnica ELISA para semi-cuantificar subclases de IgG (en una única dilución 1:200). En el gráfico E4 se representan los valores de IgG<sub>2b</sub> y en el gráfico E5 de IgG<sub>1</sub> a los 63 dpi para todas las dosis ensayadas.

**Gráfico E4. Evaluación de la respuesta IgG<sub>2b</sub>/IgGTotal en ratas inmunizadas con la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del adyuvante del ODN 504 a los 63 d.p.i.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes diluciones (1/5; 1/25; 1/125 y 1/625) de la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50 µg. de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de la relación de IgG<sub>2b</sub>/IgGtotal específica en suero de cada grupo experimental a los 63 días post inmunización (d.p.i) + el desvío estándar de tres experimentos independientes. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto a la dilución 1/5 (Dil 1/5) del grupo control.

**Gráfico E5. Evaluación de la respuesta IgG<sub>1</sub>/IgGTotal en ratas inmunizadas con la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del adyuvante del ODN 504 a los 63 d.p.i.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes diluciones (1/5; 1/25; 1/125 y 1/625) de la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50 µg. de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de la relación de IgG<sub>1</sub>/IgGtotal específica en suero de cada grupo experimental a los 63 días post inmunización (d.p.i) + el desvío estándar de tres experimentos independientes.

En el análisis de la relación  $IgG_{2b}/IgG_{Total}$  en ausencia y en presencia del adyuvante no se encontraron diferencias significativas para ninguna de las dosis ensayadas. Sin embargo, en las dosis 1/125 y 1/625 los valores que representan este índice son superiores y más homogéneos en presencia del adyuvante (gráfico E4). En la relación  $IgG_{2b}/IgG_{Total}$  se representan valores superiores a 1 (uno) debido a que la metodología utilizada para medir la  $IgG_{Total}$  fue mediante la técnica ELISA directo, y para las sub-clases ( $IgG_{2b}$  e  $IgG_1$ ) se empleó la técnica ELISA indirecto.

Si bien en rata es controvertido vincular la relación de las sub-clases con el tipo de respuesta T, se puede observar que a diluciones mayores de la vacuna (1/125 y 1/625), en presencia del ODN 504 se conserva la relación  $IgG_{2b}/IgG_{Total}$ , mientras que en los grupos controles disminuye significativamente. Estos resultados podrían estar indicando una tendencia de la respuesta T hacia  $Th_1$ .

En el gráfico E5 se representa la relación  $IgG_1/IgG_{Total}$ , como se puede observar en todas las dosis estudiadas no se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y el tratado con el ODN 504. Además, el agregado del oligonucleótido 504 no modifica la cantidad de  $IgG_1$  en ninguna de las dosis analizadas.

Tomando en conjunto los resultados serológicos, podemos determinar que el ODN 504 posee un efecto adyuvante junto a la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en las dosis 1/125 y 1/625.

El siguiente objetivo planteado por nosotros consistió en evaluar la protección en los animales vacunados en ausencia y en presencia del ODN 504 con el objeto de determinar el grado de protección en aquellos animales que recibieron el adyuvante.

**Evaluación de la protección obtenida en ratas de la cepa Sprague-Dawley vacunadas y desafiadas con el virus de la rabia utilizando como adyuvante el ODN 504 junto a la vacuna comercial de la rabia, VeroRab<sup>®</sup> Sanofi Pasteur.**

En función de los resultados obtenidos utilizando la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) y el ODN 504, el presente estudio consistió en realizar un desafío con el virus vivo de la rabia en los animales previamente inmunizados con distintas dosis de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del ODN 504.

Para realizar este estudio primero fue necesario determinar la DL50 (Dosis Letal 50) en ratas de la cepa Sprague-Dawley (primera etapa), y luego desafiar a los animales previamente inmunizados con la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia y en presencia del ODN 504 con 100 DL50 (segunda etapa).

**Primera etapa: determinación de la DL50 en ratas de la cepa Sprague-Dawley**

Para este estudio se conformaron 6 (seis) grupos de 5 (cinco) animales cada uno. Se realizaron 5 (cinco) diluciones del virus a partir de la DL50 en ratón ( $1 \times 10^6$ ), de manera que cada grupo recibió una dilución diferente de la DL50 ratón ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ). Por último, al grupo control se le inoculó el buffer de dilución del virus de la rabia (buffer NIH al 2% en suero normal equino).

Para llevar a cabo las inoculaciones del virus vivo, a cada animal se le realizó una perforación en el cráneo con un torno odontológico, para este procedimiento los animales fueron previamente anestesiados con una dosis de Ketamina/Xilacina. Luego se inocularon 0.03mL de las diferentes diluciones del virus por vía intracerebral.

Este procedimiento, al igual que el desafío de la etapa 2 (dos), se realizó en las instalaciones del Laboratorio San Jorge Bagó, los cuales poseen laboratorios de seguridad biológica aptos para trabajar con el virus rábico. El procedimiento experimental como así la evaluación de los resultados estuvo a cargo de la Dra. Veterinaria Verónica Sierra, directora del laboratorio Control de Procesos del Departamento de Microbiología del Laboratorio San Jorge Bagó.

Luego de la inoculación del virus rábico los primeros signos de la enfermedad usualmente aparecen a los 4-6 días, antes de este tiempo cualquier manifestación clínica observable o muerte del animal se deben al procedimiento realizado.

Los signos clínicos característicos de la infección por el virus rábico están relacionados con diferentes alteraciones del sistema nervioso central como por ejemplo: temblores, movimientos circulares, convulsiones, parálisis etc. que culminan con la muerte del animal.

Durante esta primera etapa cada animal fue observado durante un período de 21 días, dos veces al día, a la mañana (8-9 a.m.) y a la tarde (3-4 p.m).

Los resultados de la sobrevida en cada grupo experimental fueron registrados en una planilla donde se consideró como positivos a los animales muertos y como negativos a los animales vivos, tabla E1.

**Tabla E1. Resultados de la sobrevida en ratas Sprague-Dawley inoculadas con diferentes dosis de la DL50 en ratón.**

	Diluciones del virus a partir de la DL50 en ratón ( $1 \times 10^6$ )					Control
	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-7}$	
<b>Positivos</b>	4	1	4	1	0	0
<b>Negativos</b>	0	3	1	4	5	5

Ratas de la cepa Sprague-Dawley (5 por grupo) fueron inoculados intra-cranealmente con (cinco) diluciones del virus a partir de la DL50 en ratón ( $1 \times 10^6$ ), de manera que cada grupo recibió una dilución diferente de la DL50 ratón ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$ ). Por último al grupo control se le inoculó el buffer de dilución del virus de la rabia (buffer NIH al 2% en suero normal equino). Se observaron los animales durante 21 días. Los números positivos corresponden a los animales muertos y los negativos a los animales vivos.

Se puede observar que los grupos correspondientes a las diluciones  $10^{-3}$  y  $10^{-4}$  presentan un N experimental de 4 y no de 5. El registro de observación de animales indicó que un animal de cada grupo se encontró muerto el mismo día que se realizó la descarga (probablemente debido al procedimiento empleado).

Utilizando los datos de la tabla 1 y aplicando el método *Reed & Muench* (139) se obtuvo la DL50 en ratas Sprague-Dawley igual a:  $1 \times 10^{6,65}$ /mL.

### **Segunda etapa: Inmunización y evaluación de la Respuesta de anticuerpos.**

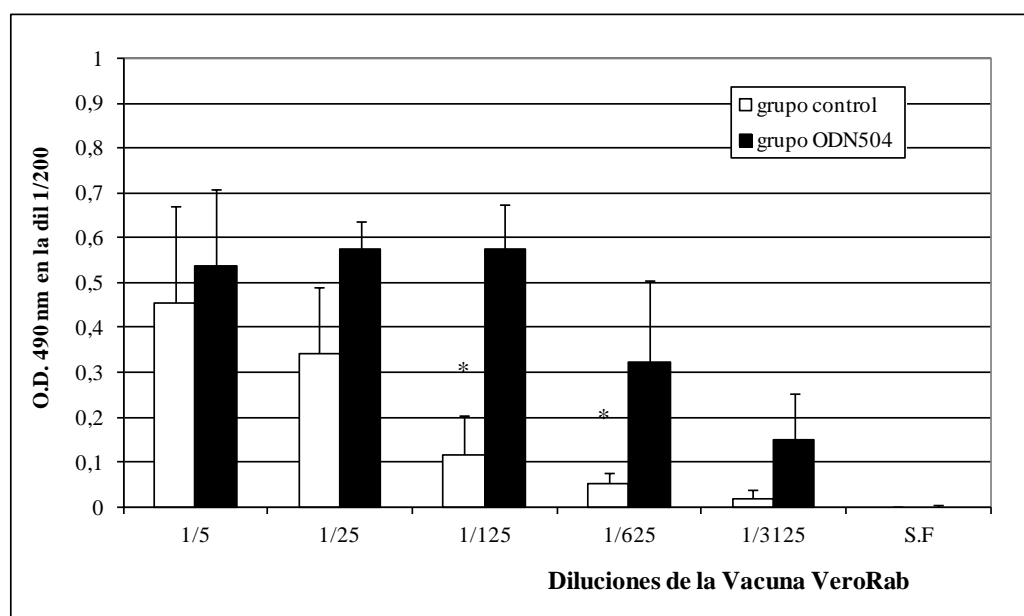
En esta etapa se inmunizaron 12 (doce) grupos de 10 (diez) animales cada uno con diluciones de la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur). Cada grupo recibió una dosis diferente de la vacuna en ausencia (grupo control) y en presencia del ODN 504 (grupo ODN 504), las diluciones empleadas fueron las siguientes: 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 y 1/3125. Además se inocularon 2 (dos) grupos controles, uno con Solución Fisiológica y el otro con el ODN 504.

A los 19 días post-inoculación se le extrajo una muestra de sangre a cada animal con el objetivo de determinar la respuesta sérica de anticuerpos IgG Total específica mediante la técnica ELISA. Luego de obtener las muestras de sangre, los animales fueron transportados a las instalaciones de San Jorge Bagó para llevar a cabo el desafío con el virus vivo (descarga).

En el siguiente gráfico (E6) se representan los resultados obtenidos de la serología. Los valores obtenidos en la determinación de anticuerpos IgG Total específica a los 19 d.p.i. fueron mayores en aquellos animales que recibieron el antígeno más el ODN 504 en las dosis 1/125, 1/625 y 1/3125. Estos resultados son similares al protocolo anterior durante el mismo período de estudio (19 dpi).

El máximo de la respuesta se observó, nuevamente, en la dilución 1/125. En esta oportunidad se testeó una dilución mas con respecto al protocolo anterior, la dilución 1/3125. Se puede observar que en ausencia del adyuvante la respuesta es prácticamente indetectable, sin embargo en presencia del adyuvante los valores que presenta este grupo se encuentran en el orden de los valores obtenidos en la dilución 1/125 en ausencia del oligonucleótido.

**Gráfico E6. Valores de anticuerpos IgG específica en suero en los animales que van a ser desafiados con el virus de la rabia.**

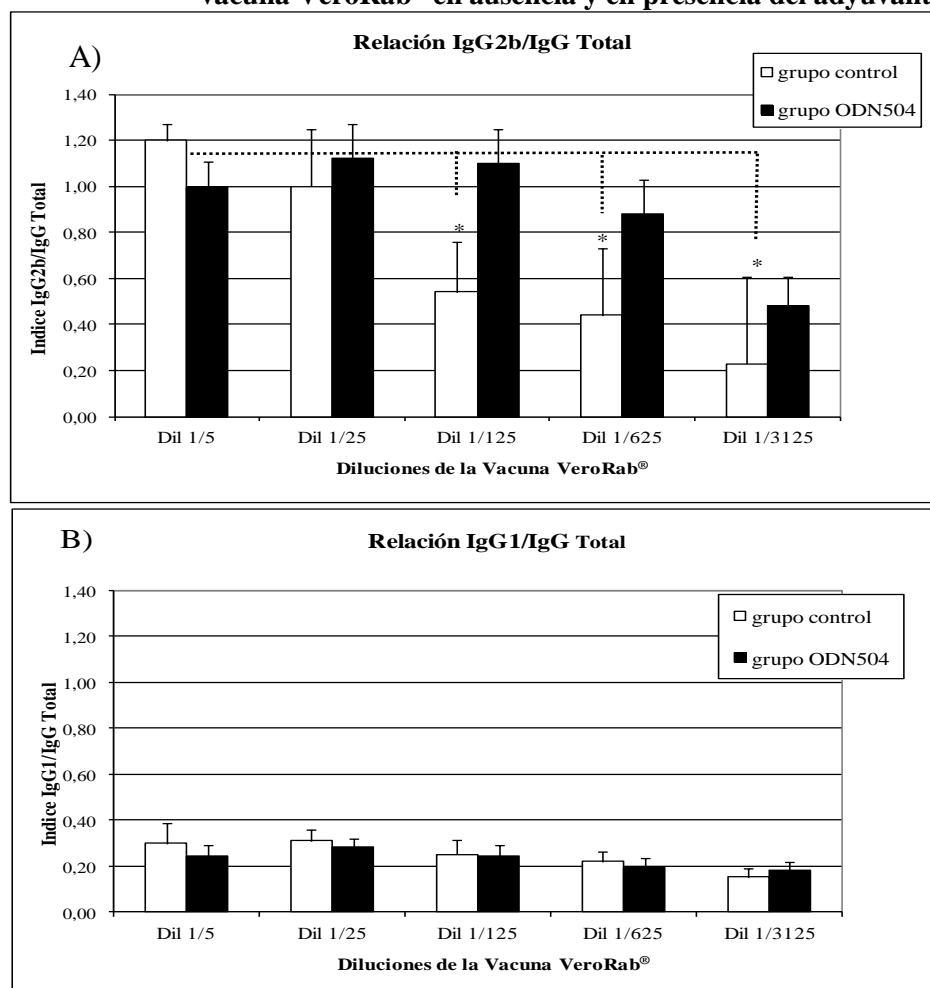


Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes diluciones (1/5; 1/25; 1/125; 1/625 y 1/3125) de la vacuna comercial de la rabia VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50µg. de ODN 504 por animal. Además, se inocularon 2 (dos) grupos con Solución Fisiológica (S.F.) en ausencia y en presencia del ODN 504. Cada barra representa el promedio de la O. D. a 490nm de IgG total específica anti el virus de la rabia en suero en la dilución 1/200 + el desvío estándar, determinado por Elisa a los 19 d.p.i. Diferencias significativas se encontraron en las diluciones 1/125 y 1/625. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.



Otro de los parámetros que se evaluó fue el perfil de la respuesta de los animales inmunizados en ausencia y en presencia del adyuvante ODN 504, para ello se determinaron los valores de D.O a 490nm en la dilución 1/200 para las sub-clases IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>1</sub> a los 19 d.p.i. Como se puede observar en los gráficos E7 A y B, en ninguna de las subclases y diluciones analizadas se encontraron diferencias entre los grupos tratados con el adyuvante en comparación con sus respectivos controles. Sin embargo, nuevamente se puede observar que tanto en el protocolo anterior (63 d.p.i. gráfico E4) como en el mencionado más arriba (19 d.p.i. gráfico E7A), la relación IgG<sub>2b</sub>/IgG<sub>Total</sub> se mantiene elevada en los grupos que recibieron la vacuna en presencia del ODN 504, mientras que en los grupos controles disminuye significativamente conforme a la dosis.

**Gráfico E7. Evaluación de la respuesta IgG<sub>2b</sub>/IgG<sub>Total</sub> e IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>Total</sub> en ratas inmunizadas con la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del adyuvante del ODN 504 a los 19 d.p.i.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes diluciones (1/5; 1/25; 1/125; 1/625 y 1/3125) de la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia o presencia de 50 µg de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de la relación de A) IgG<sub>2b</sub>/IgG<sub>total</sub> B) IgG<sub>1</sub>/IgG<sub>total</sub> específica en suero de cada grupo experimental a los 19 días post inmunización (d.p.i) + el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto a la dilución 1/5 (Dil 1/5) del grupo control.

Vinculando estos resultados con los obtenidos en el protocolo anterior en el cual los sueros se analizaron a los 63 dpi, podemos inferir que el aumento del índice  $IgG_{2b}/IgG_{Total}$  sobre  $IgG_1/IgG_{Total}$  se establece a los 19 dpi y se mantiene hasta los 63 dpi (correspondiente al último período analizado por nosotros) y el agregado del adyuvante no modifica el perfil establecido.

En este sentido, el ODN 504 potencia las cualidades propias del antígeno aún a bajas concentraciones.

### **Efectividad de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del ODN 504 desafiadas con 100 DL50 en ratas de la cepa Sprague-Dawley**

A los 21 dpi se llevo a cabo el desafío o descarga del virus vivo con 100 DL50 en los animales inmunizados en la etapa anterior, en las instalaciones del Laboratorio San Jorge Bagó, en iguales condiciones a las descriptas anteriormente. Una vez finalizado este procedimiento, los animales fueron observados por un período de 21 días, los resultados se muestran en la tabla E2.

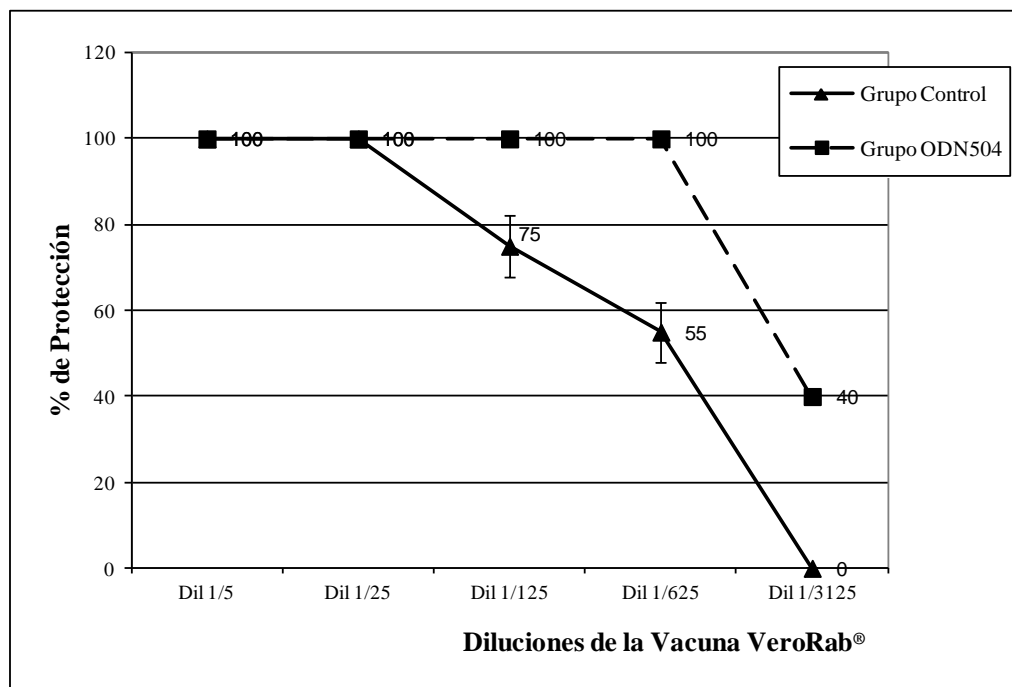
**Tabla E2. Desafío con 100 DL50 en ratas de la cepa Sprague-Dawley inmunizadas con diferentes dosis de la Vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia o presencia del oligonucleótido 504.**

Diluciones de la Vacuna VeroRab <sup>®</sup>	% de Protección con 100DL50	
	Grupo Control	Grupo ODN504
1/5	100%	100%
1/25	100%	100%
1/125	75%	100%
1/625	55%	100%
1/3125	0%	40%

Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizados intramuscularmente con diferentes diluciones de la Vacuna comercial (1/5; 1/25; 1/125; 1/625 y 1/3125) VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ausencia o en presencia del ODN 504. Las dosis 1/25, 1/125 y 1/625 fueron evaluadas en dos experimentos independientes de 10 animales cada uno, el porcentaje (%) de protección en estas dosis representa el promedio de la protección en ambos ensayos. A los 21 d.p.i. fueron desafiadas con 100DL50 intra-cerebralmente. Los animales fueron observados por un período de 21 días.

En presencia del adyuvante se observó un 100% de protección en 4 (cuatro) de las 5 (cinco) dosis testeadas de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (1/5, 1/25, 1/125 y 1/625), mientras que en los animales controles este porcentaje de protección se alcanzó sólo en las dosis más concentradas de la vacuna (1/5 y 1/25), gráfico E8.

**Gráfico E8. Porcentaje de protección de animales desafiados con 100DL50, previamente inmunizados con diferentes dosis de la Vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en presencia o en ausencia del ODN 504.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con diferentes diluciones de la Vacuna comercial Verorab®. Las dosis 1/25, 1/125 y 1/625 fueron evaluadas en dos experimentos independientes de 10 animales cada uno, el porcentaje (%) de protección en estas dosis representa el promedio + el desvío estándar. A los 21 d.p.i. fueron desafiadas con 100DL50 por vía intracerebral. Los animales fueron observados por un período de 21 días. El porcentaje de protección se determinó como el número de animales vivos (a los 21 días) sobre el total de los animales desafiados.

En el grupo control en la dosis 1/125 el porcentaje de protección disminuyó a un 75% hasta alcanzar un 55% de protección en la dosis 1/625. Con estas mismas dosis se observó un 100% de protección en el grupo que recibió el ODN 504.

En los animales del grupo control que recibieron la dilución 1/3125 se puede observar que ningún animal sobrevivió luego de recibir la descarga (0 % de protección). Sin embargo, en presencia del adyuvante en esta misma dosis se observó un 40% de protección. En este grupo experimental el nivel de respuesta de anticuerpos fue del 37% con respecto a los valores máximos de IgG determinados (dilución 1/25).

La última dosis donde se observó un 100% de protección en el grupo Control y en el Grupo ODN 504 fue en las dosis 1/25 y 1/625 respectivamente. Por lo tanto, podemos concluir que la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en presencia del ODN 504 se puede diluir 25 (veinticinco) veces (de 1/25 a 1/625) y aún así generar niveles de protección del 100%.

Hay que tener en cuenta que una dilución más al quinto (1/5) en el grupo ODN 504 representado por la dilución 1/3125, la protección disminuye abruptamente al 40%.

Vinculando ambos resultados, podemos concluir que en presencia del ODN 504 es posible realizar una dilución de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) superior a 1/5 e inferior a 1/25 ( $>1/5 < 1/25$ ) y obtener un 100% de protección.

Resultados sorprendentes encontramos en el grupo al cual se les inoculó Solución Fisiológica en presencia del adyuvante, donde la protección obtenida en este grupo fue del 50%. Hay que tener en cuenta que el N experimental en este grupo fue igual a 4 (cuatro), con lo cual sólo sobrevivieron al desafío 2 (dos) animales. Por lo tanto, en el próximo protocolo se repitió este ensayo con un mayor N experimental.

Otro de los procedimientos experimentales que se realizó en paralelo fue el de titulación de la descarga. El objetivo de este ensayo fue el de verificar si las DL50 que se utilizaron en la descarga (100 DL50) fueron las correctas luego de llevar a cabo el procedimiento experimental a partir de la semilla o stock viral.

Para ello, se realizó una dilución  $10^{-2}$  de la descarga, de manera tal que si la descarga contiene 100 DL50 la dilución  $10^{-2}$  contendrá 1 DL50.

### **Resultados de la Titulación de la Descarga.**

Se inocularon 3 (tres) grupos de animales: el grupo 1 (uno) recibió la descarga (100 DL50), el grupo 2 (dos) recibió la dilución  $10^{-2}$  de la descarga (1 DL50) y el grupo 3 (tres) recibió medio NIH, el cual se utilizó para realizar las diluciones del virus.

El porcentaje de protección fue del 0% para el grupo 1, del 66,7 % para el grupo 2 y del 100% para el grupo 3. En función de los resultados obtenidos se concluyó que la descarga se efectuó con 100 DL50.

Vinculando los resultados de la serología y protección en los animales desafiados, podemos observar que en las dosis más concentradas de la vacuna (1/5 y 1/25) la respuesta de IgG fue máxima y similar tanto en ausencia como en presencia del adyuvante al igual que la protección obtenida y, a medida que se utilizaban dosis más diluidas de la vacuna la respuesta sérica de anticuerpos disminuía conforme se observaba una disminución en la protección de los animales desafiados.

**Determinación de las UI en las diferentes formulaciones de la Vacuna Comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur).**

Como mencionamos anteriormente, debido a que la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) contiene cantidades iguales o mayores a 2.5 UI protectoras nos vimos obligados a expresar las diferentes formulaciones de la vacuna como diluciones. Con el ánimo de determinar las UI presentes en cada dilución se testeó una Vacuna de Referencia Internacional provista por el laboratorio San Jorge Bagó. Esta vacuna contiene 14UI/vial declaradas por los organismos oficiales correspondientes.

En el presente ensayo se inmunizaron 50 (cincuenta) ratas Sprague-Dawley distribuidas en 5 (cinco) grupos de 10 (diez) animales cada uno. Las UI testeadas fueron las siguientes: 0.5UI; 0.1UI; 0.02UI; 0.004UI y 0.0008UI. En paralelo se inocularon animales con diferentes diluciones de la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) (1/5; 1/25; 1/125; 1/625; 1/3125) en ausencia y en presencia del ODN 504. Todos los animales inmunizados con la vacuna de Referencia o la Vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) recibieron una única dosis por vía intramuscular. A los 19 días post-inoculación se obtuvo una muestra de sangre para determinar los niveles de inmunoglobulinas de clase IgG específicas en suero. Dentro de los 2 (dos) a 5 (cinco) días posteriores a esta sangría, los animales se trasladaron a las instalaciones del Laboratorio San Jorge Bagó para llevar a cabo la descarga viral mediante la inoculación por vía intracerebral de 100 DL50.

Como mencionamos anteriormente, la titulación de la descarga tiene como objetivo corroborar la cantidad de DL50 en la misma. Para ello, cuatro grupos de 10 (diez) animales cada uno se inocularon con las siguientes diluciones realizadas a partir de la descarga:  $10^{-1}$ ;  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  y el cuarto grupo fue inoculado con medio NHI (medio de dilución del virus). La vía de inoculación del virus se realizó por vía intracerebral. Los animales fueron observados por un período de 21 días como se describió previamente.

Los resultados de la titulación de la descarga no fueron satisfactorios. El porcentaje de protección de la descarga (100 DL50) y de todas las diluciones testeadas ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ) fue del 100%. Estos resultados son indicativos que el inóculo de la descarga no fue el correcto. Además, tampoco se observó una dosis respuesta en los grupos inoculados con la vacuna de referencia, observándose un alto porcentaje de protección (100%-80%) en todos los grupos independientemente de las UI inoculadas. Tomando en conjunto ambos resultados podemos concluir que el procedimiento realizado durante la formulación de la descarga no fue el correcto, o que la semilla utilizada para formular la descarga no era homogénea en cuanto a su título viral. En consecuencia, no fue posible evaluar ninguno de los resultados de la sobrevida

en los animales desafiados. Si bien nuestra intención fue repetir el ensayo, desafortunadamente el laboratorio San Jorge Bagó mudó sus instalaciones y debido a ello no se pudo llevar a cabo una repetición del mismo.

Los resultados en cuanto a los niveles de anticuerpos en suero a los 19 d.p.i. en los grupos que recibieron la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) fueron consistentes con los valores encontrados previamente.

Hasta aquí, los resultados observados demostraron que el ODN 504 actúa como adyuvante junto a la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en ratas de la cepa Sprague-Dawley. Su actividad adyuvante se reflejó en un aumento de la respuesta de anticuerpos del tipo IgG como en la protección generada en los animales inmunizados en presencia del oligonucleótido.

Desde el punto de vista económico este resultado sería de gran utilidad debido al alto costo que poseen las vacunas provenientes de cultivos celulares, lo cual en muchas ocasiones es la principal causa de interrupción del esquema de vacunación propuesto por la Organización Mundial de la Salud.

En función de estos resultados el siguiente objetivo fue determinar la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur) en humanos.

### **Evaluación de la acción del ODN 504 junto a la vacuna comercial de la rabia VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur), en humanos.**

Los resultados obtenidos hasta aquí en ratas de la cepa Sprague-Dawley demostraron la actividad adyuvante del ODN 504 cuando se administró junto con la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur). La administración del ODN 504 en estos animales aumentó la respuesta sérica de anticuerpos y protegió en un 100% a los animales desafiados con 100DL50 cuando se utilizaron diluciones de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur).

Basándonos en estos resultados, decidimos evaluar la actividad del ODN 504 en humanos utilizando una dilución al quinto de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur).

Para llevar a cabo este procedimiento experimental se conformaron 2 (dos) grupos de individuos del sexo masculino. Todos los individuos fueron voluntarios sanos los cuales firmaron un consentimiento de acuerdo a las Normas Éticas Internacionales de Investigaciones Biomédicas las cuales involucran humanos voluntarios.

Los individuos recibieron una dilución al 1/5 (quinto) de la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia (Grupo Control) o en presencia de 1mg del ODN 504 (Grupo ODN 504).

El esquema de inmunización empleado consistió en 3 (tres) inoculaciones por vía intramuscular en el brazo derecho a los 0, 30 y 60 días. Luego de cada inmunización se obtuvieron muestras de suero a los 15 y 30 días, a los cuales se les determinó los niveles de IgG Total específica mediante la técnica ELISA desarrollado en nuestro laboratorio. En la siguiente tabla (E3) se representan los valores de OD a 490nm en muestras de suero (dilución 1/100).

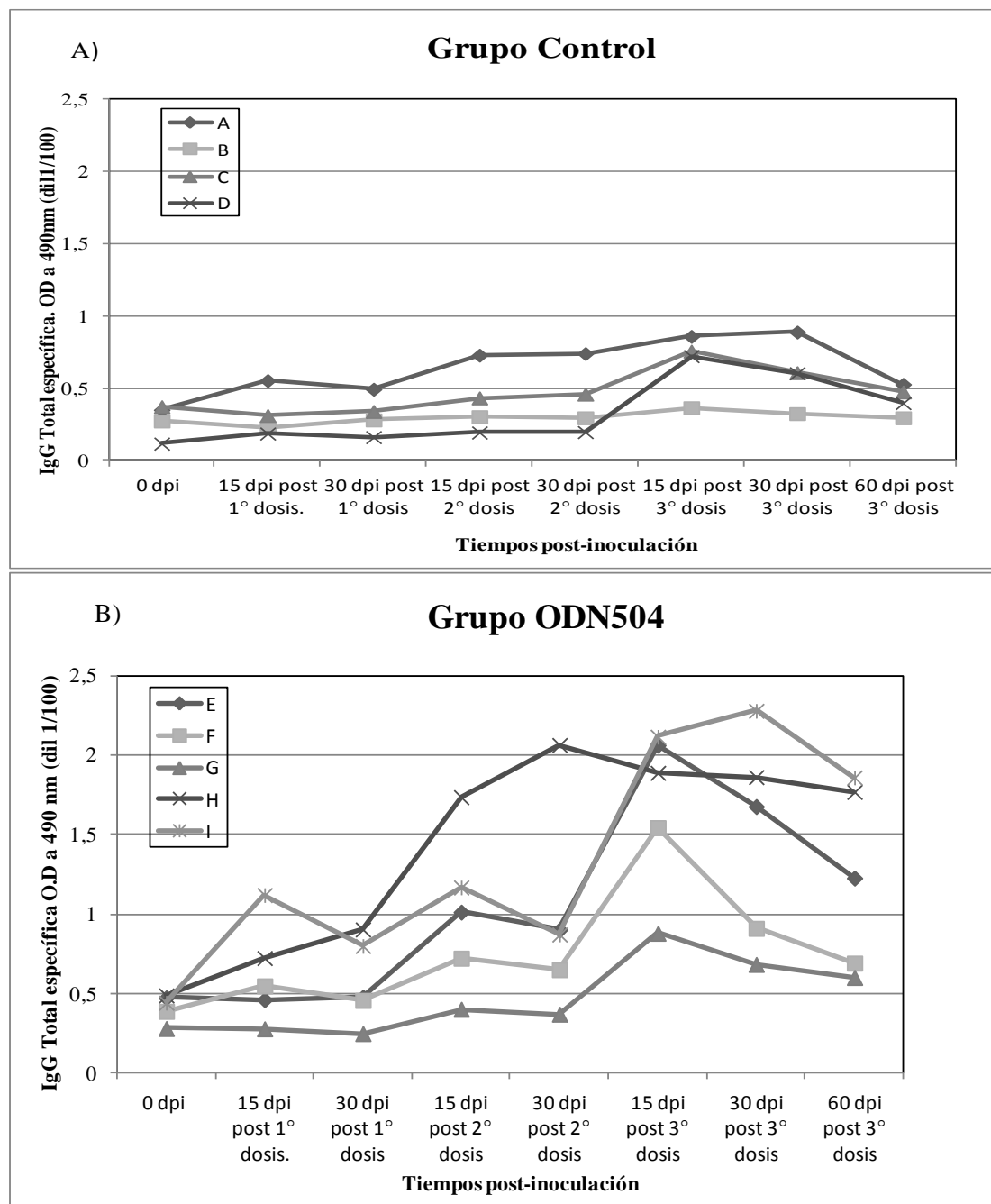
**Tabla E3. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna VeroRab® en humanos.**

Tiempos post-inoculación	Grupo Control				Grupo ODN504				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	IgG Total (O.D a 490nm)				IgG Total (O.D a 490nm)				
0 dpi	0,351	0,274	0,373	0,117	0,475	0,390	0,282	0,490	0,444
15 dpi post 1° dosis.	0,554	0,228	0,312	0,187	0,463	0,550	0,280	0,725	1,121
30 dpi post 1° dosis	0,494	0,281	0,340	0,162	0,479	0,459	0,250	0,905	0,801
15 dpi post 2° dosis	0,730	0,304	0,434	0,194	1,014	0,724	0,403	1,737	1,169
30 dpi post 2° dosis	0,741	0,296	0,460	0,197	0,903	0,652	0,372	2,065	0,873
15 dpi post 3° dosis	0,860	0,366	0,758	0,723	2,064	1,545	0,881	1,890	2,117
30 dpi post 3° dosis	0,890	0,325	0,609	0,605	1,678	0,912	0,685	1,863	2,280
60 dpi post 3° dosis	0,528	0,296	0,475	0,398	1,228	0,693	0,603	1,770	1,861

Humanos voluntarios fueron inoculados con 3 (tres) dosis de una dilución al quinto de la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia (Grupo Control) o en presencia de 1 mg de ODN 504 (Grupo ODN 504). A diferentes tiempos post inoculación se determinaron los niveles de anticuerpos IgG específicos en suero en la dilución 1/100 mediante la técnica ELISA. O.D. de sus siglas en inglés optical density.

Los valores en promedio de O.D. en el grupo que recibió el ODN 504 como adyuvante son superiores a los encontrados en el grupo control. En ambos grupos se pudo evidenciar un claro aumento de la respuesta con respecto a los valores basales luego de recibir la tercera dosis (15 dpi post 3° dosis). Sin embargo, ningún individuo del grupo control presentó valores superiores a 1 (uno) de O.D. durante todo el tiempo de estudio, gráfico E9A).

**Gráfico E9. Evaluación de la respuesta sérica de anticuerpos hacia la vacuna VeroRab® en ausencia y en presencia del adyuvante ODN 504 humanos.**



Evolución de la respuesta de anticuerpos de clase IgG en humanos voluntarios (individuos A/I) inoculados con 3 (tres) dosis de una dilución al quinto de la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia (A) o en presencia de 1 mg de ODN 504 (B). A diferentes tiempos post inoculación se determinaron los niveles de anticuerpos IgG específicos en suero en la dilución 1/100 mediante un ELISA

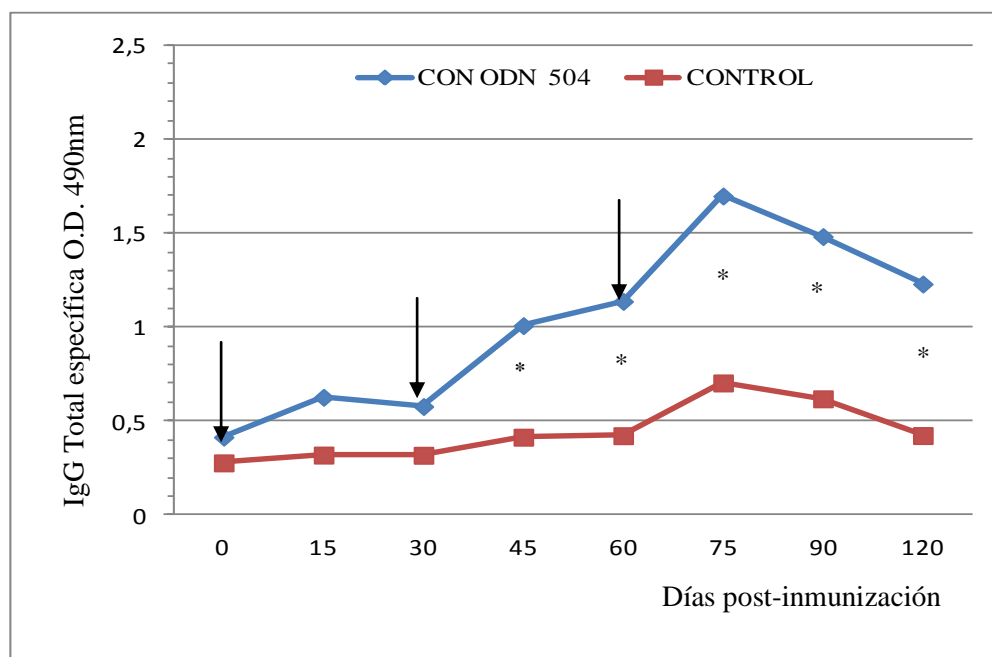
Los valores máximos de la respuesta hacia la vacuna VeroRab® en el grupo control lo presentó el individuo "A" luego de recibir la tercera dosis (O.D.=0.86). Como mencionamos anteriormente, un



comportamiento similar en cuanto a la evolución de la respuesta de IgG se puede observar en el grupo que recibió el ODN 504, donde la mayoría de los individuos de este grupo (4 de 5) presentaron valores de O.D. superiores a 1 (uno) gráfico E9 B. El valor más bajo en este grupo lo presentó el individuo “G”, sin embargo sus valores se encuentran en el orden de los valores generados por el grupo control.

Como se observa en el gráfico E10, a partir de las 2 (dos) semanas de realizar la segunda dosis (45 días de iniciado el protocolo), se encontraron diferencias significativas entre el grupo que recibió la vacuna comercial VeroRab® en presencia del adyuvante ODN 504 versus el grupo control.

**Gráfico E10. Evolución de la respuesta de anticuerpos hacia la vacuna VeroRab® en el Grupo ODN 504 comparado con el Grupo Control.**



Promedio en OD a 490 nm de la respuesta de anticuerpos de clase IgG en humanos voluntarios inoculados con 3 (tres) dosis de una dilución al quinto de la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia (Control) o en presencia de 1 mg de ODN 504 (con ODN 504). Las flechas indican los tiempos en los cuales se llevo a cabo las inoculaciones. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

Estos resultados demuestran por primera vez la actividad adyuvante del ODN 504 en humanos. La determinación de anticuerpos específicos de clase IgG en humanos se realizó mediante la técnica ELISA directo puesto a punto en nuestro laboratorio.

La glicoproteína G es la responsable de generar anticuerpos neutralizantes, los cuales confieren protección contra el desarrollo y establecimiento de la enfermedad. La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que un nivel de anticuerpos hacia la glicoproteína G igual o superior a 0.5UI/mL

constituye un nivel de seroconversión por encima del cual podría considerarse que la vacunación ha tenido éxito (140).

El siguiente paso consistió en determinar las unidades equivalentes en las muestras obtenidas utilizando el kit de Platelia™ Rabies II. Este kit consiste en una prueba de diagnóstico *in vitro* que permite la detección y valoración de la IgG contra la glicoproteína G del virus de la rabia en suero o en plasma. Además, se utilizan controles positivos calibrados con patrones de la OMS, permitiendo así la determinación cualitativa y/o cuantitativa del título de anticuerpos contra el virus de la rabia en cada muestra. En la siguiente tabla (E4) se muestran los títulos de los sueros expresados en unidades internacionales por mL (UI/mL).

**Tabla E4. Determinación de las UI/mL en humanos vacunados con la vacuna VeroRab® en ausencia y en presencia del ODN 504.**

Tiempos post-inoculación	Grupo Control				Grupo ODN504				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I
	UE/mL				UE/mL				
15 dpi post 1° dosis.	0,50	<0,1	<0,1	<0,1	0,10	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
30 dpi post 1° dosis	0,56	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	1,02	<0,1
15 dpi post 2° dosis	6,07	2,23	0,47	0,94	13,86	22,62	1,6	26,47	20,95
15 dpi post 3° dosis	4,92	2,06	3,86	2,77	32,36	31,12	3,79	45,94	41,73

Título de anticuerpos en UI/mL en humanos voluntarios (individuo A/I) inmunizados con 3 (tres) dosis de una dilución al quinto de la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) en ausencia (Grupo Control) o en presencia de 1 mg de ODN 504 (Grupo ODN 504) Los niveles protectores definidos por la OMS  $\geq 0.5$ UI/mL. Los valores basales en todos los casos fueron  $<0.1$ UI/mL. Las UI/mL se determinaron utilizando el kit de Platelia™ Rabies II (Bio Rad).

Se puede observar que en ambos grupos, a excepción del individuo “C” del grupo control, todos los individuos sero-convirtieron luego de recibir la segunda dosis.

Los valores en el grupo ODN 504 luego de 15 días de recibir la tercera dosis son en promedio diez veces superiores a los obtenidos por el grupo control. Estos datos son consistentes a los obtenidos por el Elisa desarrollado en nuestro laboratorio (tabla E3).

De acuerdo con la prueba Platelia™ Rabies II y el criterio establecido por la OMS los valores encontrados en el grupo que recibió el adyuvante ODN 504 corresponden en todos los casos a individuos que presentan una elevada seroconversión (seroconvertido +++).

Con el objetivo de poder comparar la respuesta utilizando un quinto de la vacuna comercial versus la respuesta generada utilizando la dosis completa de la vacuna, se determinaron las UI/mL en el suero de tres individuos vacunados según el esquema recomendado por la OMS (tres dosis vacunales completas con la vacuna comercial VeroRab® Sanofi Pasteur).

**Tabla E5. Determinación de las UI/mL en individuos vacunados con tres dosis completas de la vacuna VeroRab®.**

	<b>Individuos vacunados con tres dosis completas de la Vacuna VeroRab®</b>		
<b>Tiempos post-inoculación</b>	<b>C1</b>	<b>C2</b>	<b>C3</b>
	<b>UI/mL</b>		
<b>30 dpi post 3° dosis.</b>	<b>29,8</b>	<b>3,02</b>	<b>1,59</b>

Título de anticuerpos en UI/mL en humanos voluntarios (C1; C2 y C3) inmunizados con 3 (tres) dosis completas e la vacuna comercial VeroRab® (Sanofi Pasteur) Los niveles protectores definidos por la WHO  $\geq 0.5$ UI/mL. Las UI/mL se determinaron utilizando el kit de Platelia™ Rabies II (Bio Rad)

Como se observa en la tabla E5 los valores encontrados luego de la tercera dosis en el esquema convencional de vacunación son similares a los observados utilizando la vacuna diluida al quinto. Si bien el N es reducido, se puede observar que dos de los individuos (C2 y C3) presentan valores similares al grupo control, mientras que las UI/mL del individuo (C1) se encuentra en el orden de la respuesta generada por los individuos del grupo ODN 504.

En este estudio demostramos que la vacunación con la vacuna VeroRab® (Sanofi Pasteur) administrada con el ODN 504 genera una respuesta inmune de anticuerpos en ratas y en humanos utilizando solo una fracción (1/5) de la vacuna.

En ratas el efecto adyuvante se observó a partir de la dilución 1/125 de la vacuna VeroRab®, a esta dilución la respuesta observada en el grupo control fue disminuyendo significativamente a diferencia de la vacuna adyuvada donde la respuesta de anticuerpos IgG se mantuvo.

Con el objetivo de investigar la respuesta de anticuerpos neutralizantes se desafiaron con 100DL50 los animales inmunizados. Las curvas de protección generada en los animales inmunizados con la vacuna en presencia del ODN 504, demostraron que pequeñas dosis de antígeno son suficientes para generar una elevada respuesta protectora en estos animales.

En humanos también se encontraron resultados favorables, el agregado del ODN 504 a la vacuna VeroRab® generó en promedio un aumento de hasta 10 veces las UI/mL. Los resultados de esta prueba piloto sugieren la posibilidad de utilizar el ODN 504 como adyuvante junto a la vacuna VeroRab® y obtener una respuesta más rápida y elevada de anticuerpos anti la glicoproteína del virus de la rabia, con valores seroprotectores ( $\geq 0.5$  UI/mL) luego de la segunda dosis. Además el 80% de los individuos alcanzaron niveles en promedio mayores a 30UI/mL.

En resumen, los resultados en ratas y humanos sugieren el uso del ODN 504 como adyuvante junto a la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup>. La efectividad del ODN 504 permitiría utilizar menor cantidad de antígeno, lo cual se vería reflejado en una reducción en los costos de la vacuna, recordemos que este es uno de los principales problemas de la implementación y/o finalización en los esquemas de vacunación antirrábica.

## Capítulo F.

### **Evaluación de la acción del ODN 504 junto a la vacuna comercial del virus de Influenza, Inflexal<sup>®</sup> V de Berna.**

La influenza es una de las más importantes causas de morbilidad y mortalidad en época invernal. El grupo de mayor riesgo son las personas mayores de 65 años, los niños menores de 4 años, y los individuos afectados por enfermedades subyacentes como enfermedades cardiovasculares, respiratorias crónicas, asma, diabetes, enfermedades renales, reumáticas, inmunodeficiencias y cáncer, entre otras. (141, 142).

El desarrollo frecuente de variantes del virus debido al cambio antigénico que presentan, es la base virológica de la epidemia estacional y el motivo de la incorporación de una o más cepas nuevas en las vacunas de influenza que se producen anualmente (143).

Cada año el virus de la Influenza cambia su estructura antigénica, por esta razón las personas deben ser inmunizadas anualmente debido a que las vacunas producidas el año anterior son parcialmente protectoras hacia las nuevas cepas virales circulantes (144).

En la actualidad, la infraestructura para la fabricación del número de dosis necesario, muchas veces no es suficiente sobre todo frente a riesgos de pandemias.

Teniendo en cuenta la actividad del ODN 504 en la reducción de la masa de antígeno en la vacuna VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi-Pasteur), resultó de interés evaluar la actividad de este adyuvante junto a la vacuna comercial Inflexal<sup>®</sup> V (Berna).

## Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial virosomal de Influenza (Inflexal<sup>®</sup> V. Berna Biotech) en ratas jóvenes adultas de la especie Sprague-Dawley.

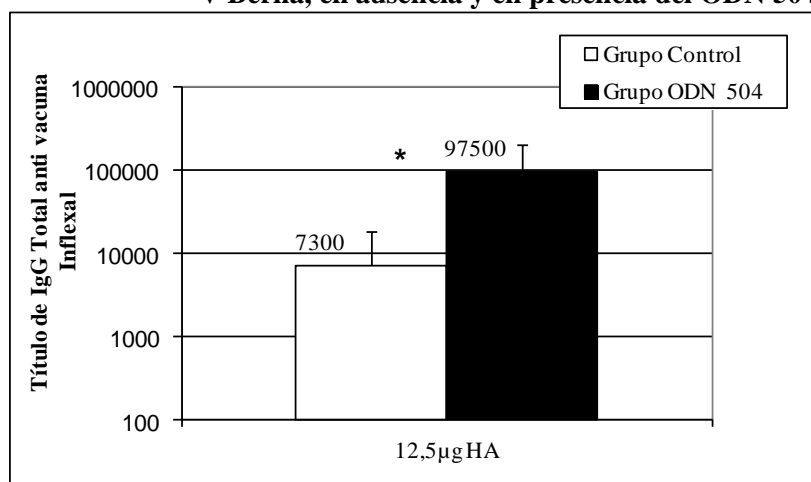
Con el objetivo de estudiar el efecto adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial virosomal Inflexal V (Berna, Biotech), ratas hembras jóvenes adultas de la cepa Sprague-Dawley fueron inoculadas con 12.5µg de Hemaglutinina (HA) en ausencia (grupo control) y en presencia del ODN 504 (grupo ODN 504).

La composición cuantitativa de una dosis vacunal en humanos es de 45µg de HA/0,5 mL. Cada dosis de la vacuna contiene como componente activo 15µg de HA de cada uno de los 3 (tres) virus de la gripe recomendados estacionalmente por la Organización Mundial de la Salud.

En todos los casos utilizamos la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V Berna correspondiente a la temporada 2002 Hemisferio Sur, las cepas incluidas en esta vacuna fueron las siguientes: 15µg de HA de la cepa A/Moscow/10/99 H2/N3, 15µg de HA la cepa A/New Caledonia/20/99 H1/N1 y por último 15µg de HA de la cepa B/Schiuan/379/99.

Todos los animales fueron inmunizados con una única dosis en ausencia (grupo control) o en presencia de 50µg del adyuvante ODN 504 (grupo ODN 504). En función del volumen de inoculación, cada animal recibió como máximo 12,5µg HA de la vacuna Inflexal V Berna. Luego de un mes se determinó en el suero de los animales inmunizados el título de anticuerpos de clase IgG anti-Inflexal<sup>®</sup> mediante la técnica ELISA, gráfico F1.

**Gráfico F1. Título de anticuerpos (IgG Total) en ratas jóvenes adultas inmunizadas con la vacuna Inflexal V Berna, en ausencia y en presencia del ODN 504.**

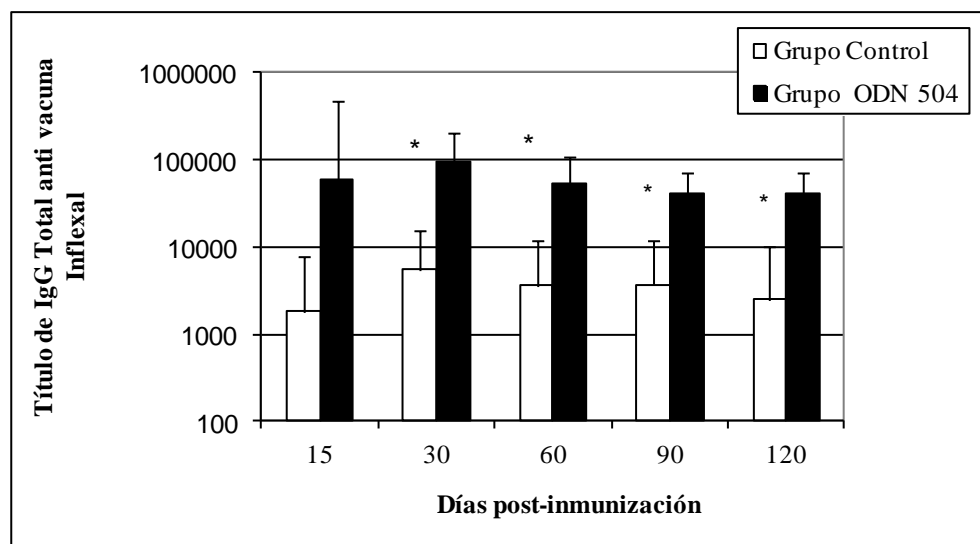


Ratas de la cepa Sprague- Dawley (10 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V (Berna Biotech Ltd. Switzerland) conteniendo 12.5µg de HA en ausencia (Grupo Control) o presencia de 50 µg. de ODN 504 (Grupo ODN 504) por animal. Cada barra representa el promedio de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 4 (cuatro) experimentos independientes. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

Los resultados muestran claramente que la adición del ODN 504 incrementa aproximadamente 13 veces la respuesta de anticuerpos específica de clase IgG hacia la vacuna de influenza Inflexal<sup>®</sup> V. Este aumento en la respuesta de anticuerpos, se observó luego de un mes de inmunizar a los animales. Con el ánimo de determinar la duración de la respuesta de anticuerpos, se determinó el título de anticuerpos a diferentes días pos-inmunización (dpi). En el gráfico F2, se puede observar el efecto adyuvante del ODN 504 durante todo el tiempo de estudio, evidenciándose el máximo de la respuesta a los 30 (treinta) dpi.

Las diferencias entre el grupo control y el grupo ODN 504 fueron estadísticamente significativas en todos los tiempos analizados, a excepción de los 15 (quince) dpi. A este tiempo, en el grupo ODN 504 se observó una marcada dispersión en los datos, por lo que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo control.

**Gráfico F2. Título de anticuerpos (IgG Total) en ratas jóvenes adultas inmunizadas con la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V Berna, en ausencia y en presencia del ODN 504 a diferentes tiempos post-inmunización.**



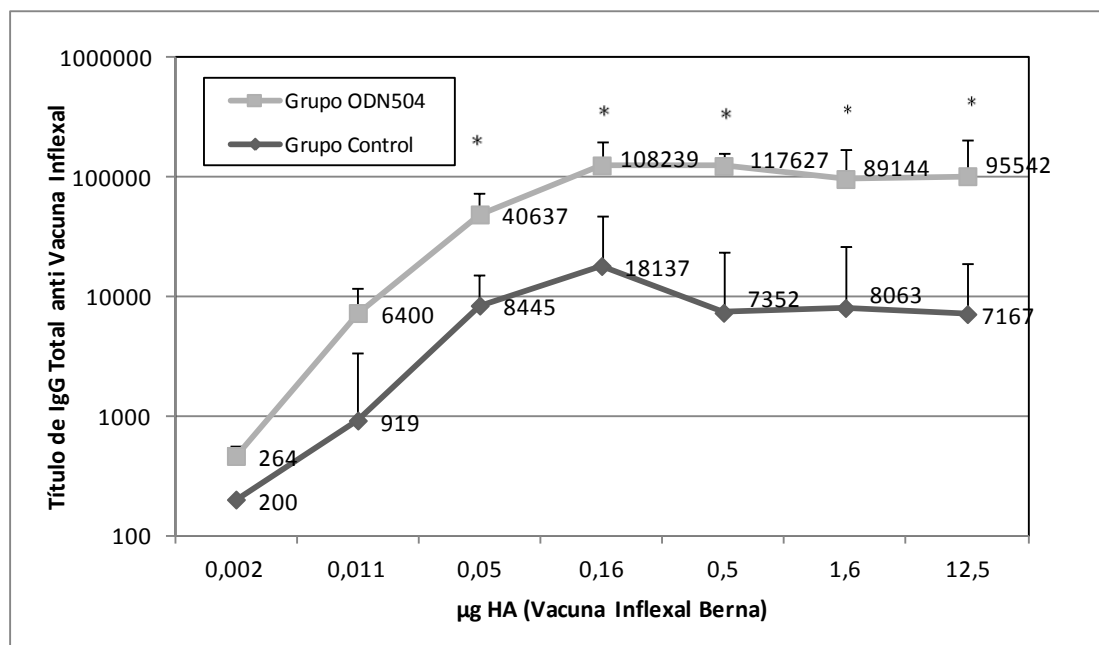
Ratas de la cepa Sprague- Dawley (10 por grupo) fueron inmunizados intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V (Berna Biotech Ltd. Switzerland) conteniendo 12.5µg de HA en ausencia o presencia de 50 µg. de ODN 504 por animal. Cada barra representa el promedio de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 4 (cuatro) experimentos independientes a diferentes días post-inmunización: 15; 30; 60 y 120. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

Estos resultados indican una vez más el efecto adyuvante del ODN 504, en esta ocasión asociado a la vacuna comercial de influenza Inflexal<sup>®</sup> V de Berna.

Una vez establecida la capacidad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial Inflexal<sup>®</sup> V, el siguiente objetivo fue determinar la mínima dosis de la vacuna antigripal que combinada con el ODN 504 continúa siendo efectiva. Para ello, diferentes dosis de la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V (desde 0.002 hasta

12.5 $\mu$ gHA) fueron inoculadas en ratas jóvenes adultas en ausencia y en presencia del ODN 504. Luego de un mes, se determinó el título de anticuerpos de clase IgG como se describió previamente, gráfico F3.

**Gráfico F3. Evaluación de la actividad del ODN 504 con diferentes dosis de la vacuna antigripal Inflexal V<sup>®</sup> en ratas jóvenes adultas.**



Ratas de la cepa Sprague- Dawley (8 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V<sup>®</sup> (Berna Biotech Ltd. Switzerland) conteniendo diferentes dosis de HA: 0.002; 0.011; 0.05; 0.16; 0.5; 1.6 y 12.5 $\mu$ g en ausencia o presencia de 50  $\mu$ g de ODN 504 por animal. La curva □ correspond al Grupo ODN 504 y la curva ▴ al Grupo Control. Se representa el promedio + el desvío estándar de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 3 (tres) experimentos independientes a 30 días post-inmunización. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) por la prueba por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto a la misma dosis del grupo control.

Con el agregado del ODN 504 a la vacuna comercial, se puede observar que la dosis de 0.011 $\mu$ g presenta un nivel de respuesta similar (6400) a la generada por la vacuna sola en la dosis de 0.05 $\mu$ g (8445), por lo tanto en presencia del ODN 504 sería posible disminuir la masa de antígeno 4.5 veces y mantener el mismo nivel de respuesta. Además, el nivel de anticuerpos IgG Total específico en las dosis de 0.05 $\mu$ g y 12.5 $\mu$ g de la vacuna adyuvada (Grupo ODN 504) aumentó en promedio 5 y 13 veces respectivamente en comparación con la vacuna sin el agregado del oligonucleótido (Grupo Control).

La eficiencia de la vacuna contra la gripe, se basa en gran medida, a la posibilidad de generar anticuerpos hacia otras cepas diferentes a las incluidas en la vacuna.

En función de los resultados encontrados, nos planteamos determinar si el aumento observado en el título de anticuerpos en el grupo que recibió el adyuvante, responde a un aumento en la respuesta de



anticuerpos generada contra los mismos epitopes que el grupo control o, si este aumento obedece a la generación de anticuerpos contra nuevos epitopes (diversidad antigénica).

Con el objetivo de responder a este interrogante el siguiente ensayo consistió en comparar cualitativamente la respuesta de anticuerpos generada por ambos grupos de experimentales, en ausencia y en presencia del ODN 504.

### **Evaluación de la diversidad antigénica por acción del ODN 504.**

Como mencionamos anteriormente, el efecto adyuvante del ODN 504 se reflejó en un claro aumento en el título de IgG total específica anti-Hemaglutinina/Neuroaminidasa (HA/NA). Con el ánimo de evaluar la calidad de la respuesta generada en ambos grupos experimentales, se realizó un ensayo de reconocimiento de diferentes epitopes de la hemaglutinina por parte de los sueros de los animales inmunizados.

El ensayo consistió en utilizar como soporte una membrana de celulosa, la cual contiene una amplia diversidad de epítopes antigénicos de la proteína mayoritaria del virus de influenza, la Hemmaglutinina (HA). Los mismos están constituidos por péptidos sintéticos de 15 aminoácidos de longitud, inmovilizados químicamente en forma de spot (○) en la membrana. Cada spot difiere del anterior por el desplazamiento de 3 aminoácidos cubriendo de esta manera el total de la secuencia de la HA. Debido a su naturaleza hidrofílica, las membranas de celulosa son particularmente adecuadas para la presentación de péptidos inmovilizados, permitiendo un rápido y sistemático análisis de epitopes. Aquellos spot que son reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de los animales inmunizados emitirán una señal colorimétrica (spot azul) que luego es documentada mediante la utilización de un scanner y analizados en función de la intensidad de color utilizando un software adecuado (Image pro plus).

La membrana fué cedida por el Dr Ronald Frank del departamento de Química Biológica del GBF (German Research Center for Biotechnology, Alemania).

A continuación se representa un ejemplo de la distribución de los péptidos de la HA de la cepa Fujian AF/411/02(H3N2) en la membrana.

		Fujian 411/2002				
		aafsc 1				
Ejemplo de la secuencia de 15 aminoácidos del spot		a	b	c	d	e(▼)
QKLPGNDNSTATLCL	← 1	○	○	○	○	○
PGNDNSTATLCL <b>GHH</b>	← 2	○	○	○	○	○
DNSTATLCL <b>GHHAVP</b>	← 3	○	○	○	○	○
	4	○	○	○	○	○
	5	○	○	○	○	○
	6	○	○	○	○	○
	7	○	○	○	○	○
	8	○	○	○	○	○
	9	○	○	○	○	○
	10	○	○	○	○	○
	11	○	○	○	○	○
	12	○	○	○	○	○
	13	○	○	○	○	○
	14	○	○	○	○	○
	15	○	○	○	○	○
	16		○	○	○	○
	17		○	○	○	○
	18		○	○	○	○
	19		○	○	○	○
	20		○	○	○	○
	21		○	○	○	○
	22		○	○	○	○
	23		○	○	○	○
	24		○	○	○	○
	25		○	○	○	○

El primer péptido correspondiente a la región N-terminal de la HA fue marcado en el borde derecho de la membrana (posición e1) y los péptidos siguientes se ubican en el sentido indicado por la flecha negra (▼). Cada spot (○) está constituido por péptidos sintéticos de 15 aminoácidos de longitud y difiere del anterior por el desplazamiento de 3 aminoácidos (en rojo) cubriendo de esta manera el total de la secuencia de la HA.

Las hemaglutininas (HA) elegidas para ser incluidas en la membrana provinieron de las siguientes cepas: A/New Caledonia/20/99 (H1N1); A/Fujian/411/2002 (H3N2) y B/ Hong Kong/330/2001

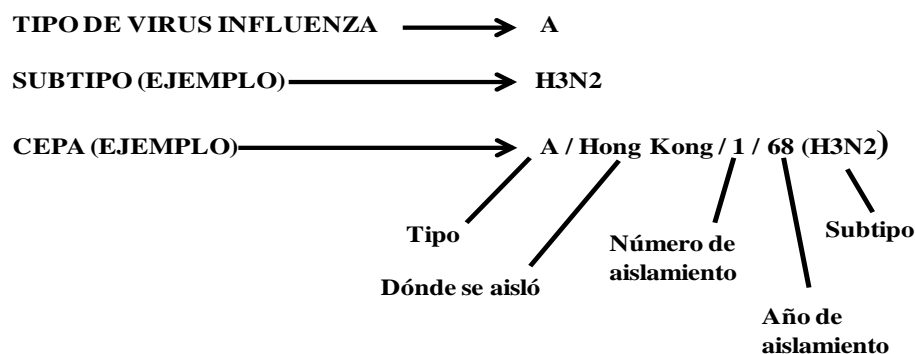
A continuación en la tabla F1, se describen las cepas virales incluidas en la vacuna y en la membrana:

**Tabla F1. Cepas vacunales A (H1N1/H3N2) y B.**

Cepas virales incluídas en la vacuna Inflexal V Berna	Cepas virales incluídas en la membrana
1) A/ New Caledonia A/C/20/99 (H1N1)	1) A/ New Caledonia A/C/20/99 (H1N1)
2) A/Moscow/10/99 (H3N2)	2) Fujian A/F/411/02 (H3N2)
3) B/Sichuan/379/99	3) B/Hong Kong/330/2001

La cepa Fujian incluida en la membrana es una cepa no relacionada a la cepa A/Moscow y la cepa B/ Hong Kong pertenece al linaje Victoria, mientras que la cepa B/Schiuan pertenece al linaje Shamagata es decir las dos cepas B provienen de dos linajes diferentes.

Recordemos que las cepas de los virus de influenza se clasifican en tipos de virus (A/B/C), lugar y año de aislamiento y sub-tipo (HxNx). A continuación, se describe la nomenclatura completa de los virus de influenza utilizados en las formulaciones vacunales en los últimos años.



(La nomenclatura de las cepas no humanas también incluye el nombre vulgar de la especie hospedadora, por ejemplo A/pollo/Taipei/2/75, H1N1).

La elección de incluir cepas virales diferentes en la membrana se realizó con el objetivo de testear la reactividad cruzada que pudiera existir en los sueros de los animales inmunizados con la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V en presencia del adyuvante.

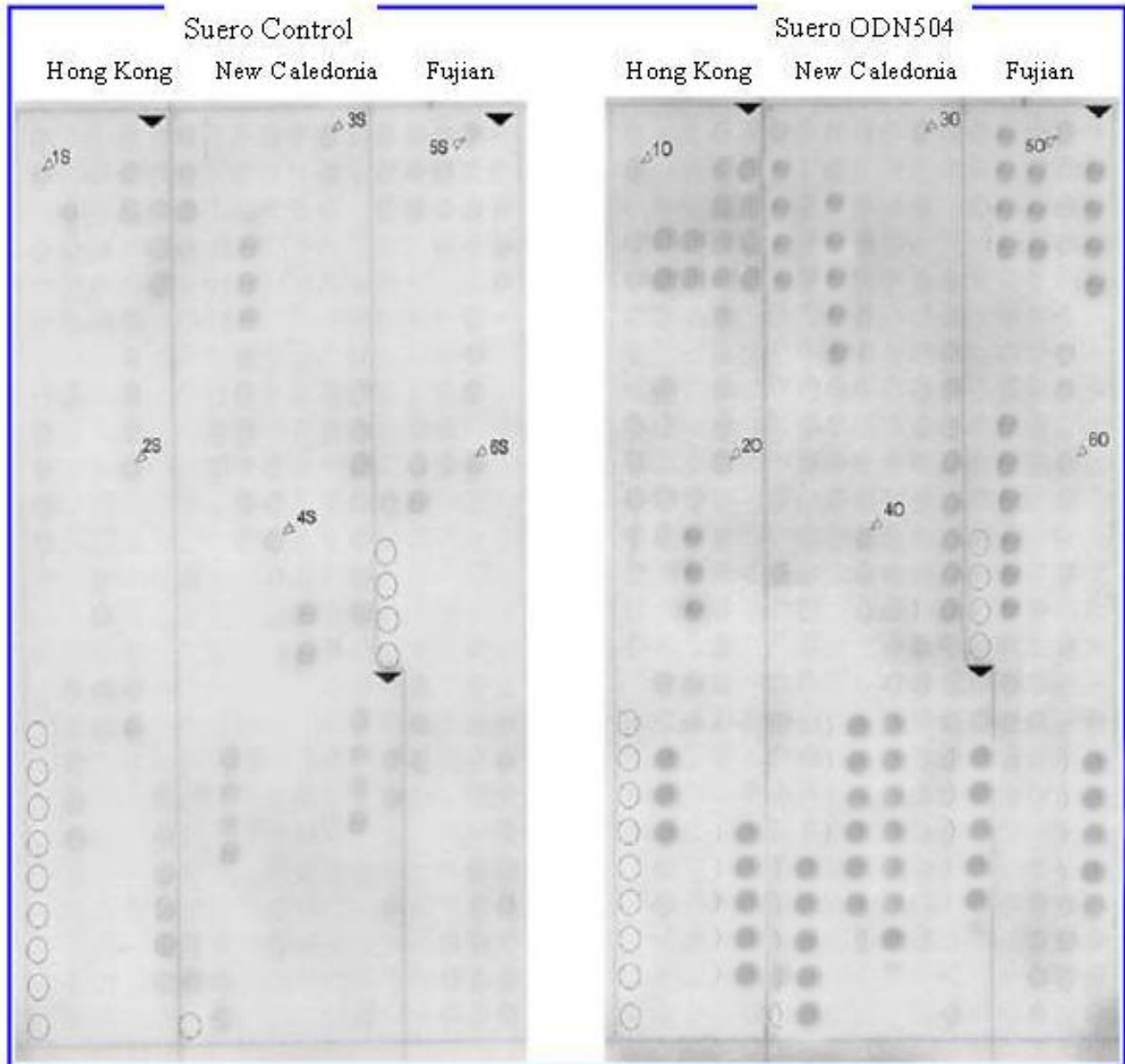
Con el ánimo de comparar la calidad de la respuesta de anticuerpos generada en los animales inmunizados con pequeñas cantidades de antígeno en presencia del ODN 504 se realizó el ensayo por un lado, con un pool de sueros de los animales inmunizados con 0.16µg HA más el adyuvante (Suero ODN 504), y por otro lado, con un pool de sueros proveniente del grupo control inmunizados con la máxima concentración de la vacuna sin diluir, 12.5µg HA (Suero Control).

La comparación de la reactividad de las membranas testeadas con ambos sueros nos permitiría responder la siguiente pregunta: ¿Es posible obtener una calidad en la respuesta de anticuerpos similar a la vacuna comercial, utilizando una muy baja concentración de antígeno en presencia del adyuvante ODN 504?. De esta manera se realizó el ensayo con el pool de sueros de los animales inmunizados en presencia del adyuvante ODN 504 el cual contenía 78 veces menos cantidad de antígeno.

Los resultados fueron sorprendentes, la incubación de la membrana con el Suero ODN 504 reveló un mayor número de péptidos, que no fueron observados en la membrana tratada con el Suero Control. Los péptidos revelados en la membrana del Suero Control presentaron la misma intensidad de color con respecto a los mismos péptidos revelados con el Suero ODN 504.

A modo ilustrativo se muestra en la siguiente foto (F1) los spot de las membranas incubadas con los diferentes sueros.

Foto F1. Membrana de celulosa incubada con Suero Control o Suero ODN 504.

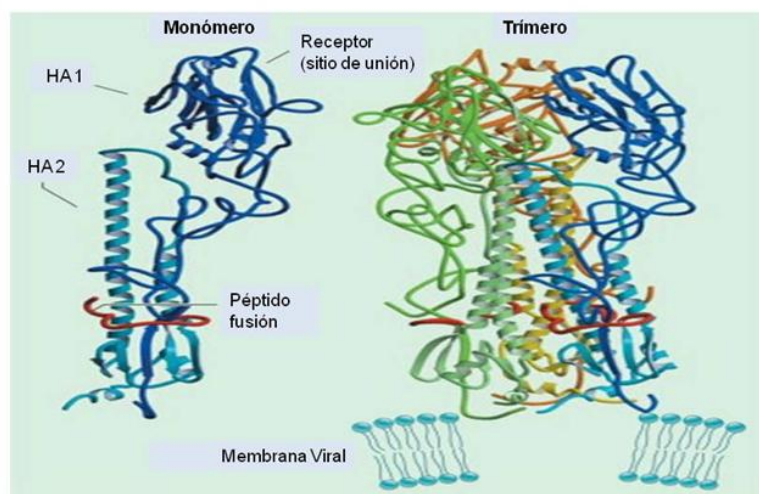


Membrana de celulosa conteniendo péptidos de 15 aminoácidos (aa) de longitud abarcando la secuencia de HA pertenecientes a las cepas de virus de la gripe: B/Hong Kong/330/2001, Caledonia/20/1999 y A/Fujian/411/2002. La membrana de la derecha se incubó con 3 pools diferentes del suero proveniente de 10 animales cada uno inmunizados con 0.16 $\mu$ g HA de la vacuna Inflexal V Berna más 50 $\mu$ g del ODN 504 (Suero ODN 504). La membrana de la izquierda se incubó con 3 pools del suero proveniente de 10 animales cada uno inmunizados con 12.5 $\mu$ g HA de la vacuna Inflexal V Berna (Suero Control) El primer péptido correspondiente a la región N-terminal de la HA fue marcado en el borde derecho de la membrana (de cada cepa) y los péptidos siguientes se ubican en el sentido indicado por la flecha negra (▼). Las puntas de flechas blancas ▲ señalan algunos spots incubados con el Suero Control (v1S) que presentan similar intensidad a los mismos spots incubados con el suero en presencia del ODN 504 (v10). Los spots identificados como ○ son péptidos de 15 aa sintetizados al azar como controles.

Este análisis cualitativo nos estaría indicando que el ODN 504 mejora la respuesta inmune generando un mecanismo que favorece el reconocimiento de una mayor diversidad antigénica.

La forma mas común de variación del virus de influenza se lleva a cabo mediante cambios de nucleótidos individuales (mutaciones puntuales) en los genes que codifican a los sitios antigénicos de la Hemaglutinina (HA) y Neuroaminidasa (NA). Este tipo de variación se conoce como “deriva antigénica” (antigenic drift). La deriva antigénica que se observa en los virus de Influenza se debe casi por completo a mutaciones en la molécula de HA (145).

Esta proteína es sintetizada inicialmente como un único precursor polipeptídico (HA0) de naturaleza homotrimérica que luego es procesada por proteasas en dos subunidades, la HA1 y la HA2 (146). La HA1 contiene el dominio globular y representa el sitio de unión a los residuos de ácido siálico de la célula huésped. Este dominio es altamente variable, mientras que la HA2 es más conservada y tiene como función llevar a cabo el proceso de fusión del virus a la célula huésped (147, 148)



Estructura tridimensional de la hemaglutinina (HA) del virus de Influenza (gripe). A la izquierda se muestra el monómero HA y a la derecha el trimero. En el monómero se puede observar la subunidad globular HA1 en azul oscuro, la subunidad HA2 en azul mas claro el "péptido de fusión" en rojo. El sitio de unión del receptor está situado en el extremo de la molécula de HA1. Esta figura fue producida por André van Eerde (Universidad de Groningen), usando MOLSCRIPT, basándose en el archivo de Banco de datos de proteínas, código 3HMG. Fuente: Weis WI et al. Refinement of the influenza virus hemagglutinin by simulated annealing. J Molec Biol 1990; 212: 737–761.

Teniendo en cuenta la función de la HA1, analizamos la reactividad de los sueros de los animales inoculados con y sin el adyuvante ODN 504 hacia este dominio.

En la figura F4, se puede observar que los anticuerpos presentes en los animales que recibieron el adyuvante ODN 504 (barras negras) cubren una amplia cantidad de péptidos de la región HA1 a diferencia del suero de los animales que recibieron la vacuna sola (barras grises).

El porcentaje de péptidos reconocidos por el pool de sueros obtenidos de animales inmunizados en presencia del ODN 504 es mayor en todos los casos (entre 31 y 53%), tanto para la cepa vacunal New Caledonia/20/1999, como para las cepas Fujian/411/2002 y B/ Hong Kong/330/2001, ambas cepas ausentes en la vacuna utilizada para inmunizar a los animales, tabla F2.

**Figura F4. Evaluación de la reactividad antigénica del adyuvante ODN 504 en el dominio HA1 de la Hemaglutinina.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
<b>New Caledonia 20 1999</b>	MKA	KLL	VLL	CTF	TAT	YAD	TIC	IGY	HAN	NST	DTV	DTV	LEK	NVT	VTH	SVN	LLE	DSH	NGK	LCL	LKG	IAP	LQL	GNC	SVA	GWI	LGN	PEC	ELL	ISK
Suero ODN504																														
Suero Control																														
	ESW	SYI	VET	FNP	ENG	TCY	PGY	FAD	YEE	LRE	QLS	SVS	SFE	RFE	IFP	KES	SWP	NHT	VTG	VSA	SCS	HNG	KSS	FYR	NLL	WLT	GKN	GLY	PNL	SKS
	YVN	NKE	KEV	LVL	WGV	HHP	PNI	GDQ	RAL	YHT	ENA	YVS	VVS	SHY	SRR	FTP	EIA	KRP	KVR	DQE	GRI	NYI	WTL	LEP	GDT	IIF	EAN	GNL	IAP	WAY
	FAL	SRG	FGS	GII	TSN	APM	DEC	DAK	CQT	PQG	AIN	SSL	PFQ	NVH	PVT	IGE	CPK	YVR	SAK	LRM	VTG	LRN	IPS	IQS						
<b>Fujian 411 2002</b>	QKL	PGN	DNS	TAT	LCL	GHH	AVP	NGT	IVK	TIT	NDQ	IEV	TNA	TEL	VQS	SST	GGI	CDS	PHQ	ILD	GEN	CTL	IDA	LLG	DPQ	CDG	FQN	KKW	DLF	VER
Suero ODN504																														
Suero Control																														
	SKA	YSN	CYP	YDV	PDY	ASL	RSL	VAS	SGT	LEF	NNE	SFN	WTG	VTQ	NGT	SSA	CKR	RSN	KSF	FSR	LNW	LTH	LKY	KYP	ALN	VTM	PNN	EKF	DKL	YIW
	GVH	HPG	TDS	DQI	SLY	AQA	SGR	ITV	STK	RSQ	QTV	IPN	IGS	RFR	VRD	VSS	RIS	IYW	TIV	KPG	DIL	LIN	STG	NLI	APR	GYF	KIR	SGK	SSI	MRS
	DAP	IGK	CNS	ECI	TPN	GSI	PND	KPF	QNV	NRI	TYG	ACP	RYV	KQN	TLK	LAT	GMR	NVP	EKQ	TRG	IFG	GAI								
<b>Hong Kong 330 2001</b>	LSL	MVV	HPM	PDR	ICT	GIT	SSN	SPH	VVK	TAT	QGE	VNV	TGV	IPL	TTT	PTK	SHF	ANL	KGT	KTR	GKL	CPK	CLN	CTD	LDV	ALG	RPK	CTG	NIP	SAK
Suero ODN504																														
Suero Control																														
	VSI	LHE	VRP	VTS	GCF	PIM	HDR	TKI	RQL	PNL	LRG	YER	IRL	SNH	NVI	NAE	KAP	GGP	YKI	GTS	GSC	PNV	TNG	NGF	FAT	MAW	AVP	KNE	NNK	TAT
	NSL	TIE	VPI	ICT	EGE	DQI	TVW	GPH	SDS	ETQ	MAK	LYG	DSK	PQK	FTS	SAN	GVT	THY	VSQ	IGG	FPN	QTE	DGG	LPQ	SGR	IVV	DYM	VQK	SGK	TGT
	ITY	QRG	ILL	PQK	VVC	ASG	RSK	VIK	GSL	PLI	GEA	DCL	HEK	YGG	LNK	SKP	YYT	GEH	AKA	IGN	CPI	VVK	TPL	KLA	NGT	KYR	PPA	KLL	KER	

Representación esquemática de los péptidos (potenciales epitopes) de la región HA1 de la HA pertenecientes a las cepas de virus de la gripe: Caledonia/20/1999 (presente en la vacuna); B/Hong Kong/330/2001, y A/Fujian/411/2002 (ausentes en la vacuna). La vacuna utilizada fue (Inflexal V; Berna Biotech). Las barras negras representan los péptidos detectados por el Suero ODN 504 (proveniente de 3 pooles diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 0.16µg HA más 50µg ODN 504) y las barras grises a los epitopes detectados por el Suero Control (proveniente de 3 pooles diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 12.5µg de HA). Las señales fueron analizadas y cuantificadas utilizando el software Image-Pro Plus. La reacción para cada spot se calculó como la intensidad de la mancha en el spot menos el fondo de la membrana que rodea cada punto. Cada spot fue analizado por separado.

Tabla F2. Reactividad de los sueros ODN 504 y Control en la sub-unidad HA1.

	SUERO ODN 504			SUERO CONTROL	
	Número total de péptidos HA1	Número de péptidos reconocidos	% de Reconocimiento	Número de péptidos reconocidos	% de Reconocimiento
New Caledonia 20 1999	114	95	83	37	32,5
Fujian 411 20002	112	84	75	49	43,8
Hong Kong 330 2001	120	105	88	42	35

Cuando se analizó el dominio HA2, los resultados fueron similares a los hallados en el análisis del dominio HA1, el suero de los animales inmunizados con la vacuna más el adyuvante reaccionó a un mayor número de péptidos (barras negras) que el suero control (barras grises). En la siguiente figura (F5) y tabla (F3) se representan los resultados de la cepa New Caledonia.

Figura F5. Evaluación de la reactividad antigénica del adyuvante ODN 504 en el dominio HA2 de la Hemaglutinina de la cepa New Caledonia.

New Caledonia 20 1999	RGL	FGA	IAG	FIE	GGW	TGM	VDG	WYG	YHH	QNE	QGS	GYA	ADQ	KST	QNA	ING	ITN	KVN	SVI	EKM	NTQ	FTA	VGK	EFN	KLE	RRM	ENL	NKR	VDD	GFL				
Suero ODN 504	[Barras negras]																																	
Suero Control																																		
	DIW	TYN	AEL	LVL	LEN	ERT	LDF	HDS	NVK	NLY	EKV	KSQ	LKN	NAK	EIG	NGC	FEF	YHK	CNN	ECM	ESV	KNG	TYD	YPK	YSE	ESK	LNR	EKI	DGV	KLE				
	[Barras negras]																[Barras grises]				[Barras grises]													
	SMG	VYQ	ILA	IYS	TVA	SSL	VLL	VSL	GAI	SFW	MCS	NGS	QCR	IC																				
	[Barras grises]																																	

Representación esquemática de los péptidos (potenciales epitopes) de la región HA2 de la HA perteneciente a la cepa del virus de la gripe: New Caledonia/20/1999 (presente en la vacuna). La vacuna utilizada fue (Inflexal<sup>®</sup> V; Berna Biotech, temporada 2002). Las barras negras representan los péptidos detectados por el Suero ODN 504 (proveniente de 3 pools diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 0.16µg HA más 50µg ODN 504) y las barras grises a los epitopes detectados por el Suero Control (proveniente de 3 pools diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 12.5µg de HA). Las señales fueron analizadas y cuantificadas utilizando el software Image-Pro Plus. La reacción para cada spot se calculó como la intensidad de la mancha en el spot menos el fondo de la membrana que rodea cada punto. Cada spot fue analizado por separado.



**Tabla F3. Reactividad de los sueros ODN 504 y Control en la sub-unidad HA2.**

	Número total de péptidos HA2	SUERO ODN 504		SUERO CONTROL	
		Número de péptidos reconocidos	% de Reconocimiento	Número de péptidos reconocidos	% de Reconocimiento
<b>New Caledonia 20 1999</b>	74	58	78	6	8

Los estudios epidemiológicos realizados en humanos, demostraron que la infección con una determinada cepa del virus de Influenza confiere muy poca o ninguna inmunidad protectora a otros subtipos de virus (149). El aumento en la reactividad observada en las membranas con el ODN 504 hacia las cepas A/Fujian y B/Hong Kong indicaría que, una formulación vacunal en presencia del ODN 504, aumentaría la reactividad hacia otras cepas no incluidas en la vacuna.

La dinámica evolutiva de los virus Influenza en aves es muy alta, probablemente por la variedad de hospedadores que puede alcanzar (150). Esta dinámica se puso a prueba durante la aparición de la nueva cepa Influenza A/H5N1. Esta cepa ha sido llamada HPAI/AH5N1, que significa virus de la influenza altamente patógena aviar tipo A subtipo H5N1, comúnmente llamada gripe aviar.

Desde el primer aislamiento del virus de Influenza aviar HPAI/H5N1 en China en 1996 y su re-emergencia y dispersión a través del sudeste asiático en el 2003, se han notificado a la Organización Mundial de la Salud 473 casos humanos procedentes de 15 países, con una letalidad del 59.6% (151). En el 2004 se estableció una epidemia en aves de corral en países asiáticos.

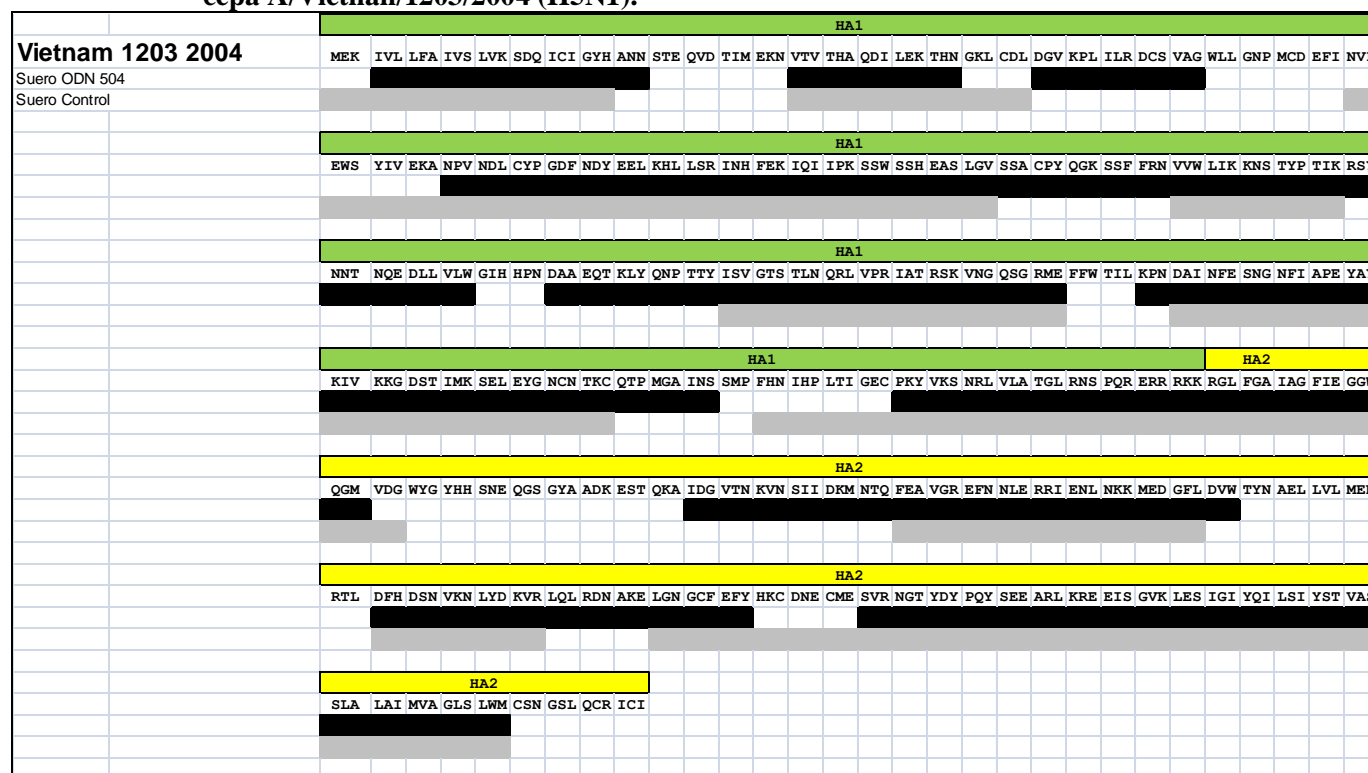
Dada sus características biológicas, epidemiológicas y antecedentes históricos (152, 153, 154), la identificación de una cepa emergente del virus de influenza aviar A H5N1 con baja transmisibilidad, pero con capacidad para transmitirse directamente de las aves a los humanos, puede causar una elevada letalidad entre los afectados (155). En este contexto, la influenza aviar HPAI/H5N1 continúa siendo un motivo de preocupación no solo como una amenaza en si misma (156), sino por la posibilidad de combinación con la cepa A/H1N1 2009 que se reflejaría en un aumento de la capacidad de transmisión de humano a humano, constituyendo un enorme desafío para la seguridad sanitaria mundial (157).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con el ODN 504 y las cepas de virus no incluidos en la vacuna, nos resultó interesante evaluar la reactividad de los sueros en ausencia y presencia del ODN 504 hacia una cepa H5N1.

Se eligió la HA de la cepa A/Vietnam/1203/2004 aislada durante el brote letal en Vietnam entre 2003 y 2005 (158) para ser incluida en la membrana de celulosa.

Los resultados fueron muy alentadores, el suero proveniente de los animales inoculados en presencia del adyuvante ODN 504 fue reactivo a un mayor número de péptidos (barras negras) que el suero control (barra gris), figura F6. El porcentaje de péptidos reconocidos por el suero ODN 504 aumentó un 10% con respecto al suero Control, tabla F4.

**Figura F6. Evaluación de la reactividad antigénica del adyuvante ODN 504 en la Hemaglutinina de la cepa A/Vietnam/1203/2004 (H5N1).**



Representación esquemática de los péptidos (potenciales epitopos) de la HA perteneciente a las cepa del virus de la gripe A/Vietnam/1203/2004 (no incluida en la vacuna). La vacuna utilizada fue (Inflexal V®; Berna). Las barras negras representan los péptidos detectados por el Suero ODN 504 (proveniente de 3 pools diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 0.16µg HA más 50µg ODN 504) y las barras grises a los epitopos detectados por el Suero Control (proveniente de 3 pools diferentes del suero de 10 animales cada uno, inmunizados con 12.5µg de HA). Las señales fueron analizadas y cuantificadas utilizando el software Image-Pro Plus. La reacción para cada spot se calculó como la intensidad de la mancha en el spot menos el fondo de la membrana que rodea cada punto. Cada spot fue analizado por separado. La barra en verde indica la secuencia del dominio HA1 y en amarillo la correspondiente al dominio HA2.

**Tabla F4. Reactividad de los sueros ODN 504 y Control en la Hemaglutinina del virus de Influenza Vietnam 1203-2004.**

	SUERO ODN 504			SUERO CONTROL	
	Número total de péptidos	Número de péptidos reconocidos	% de Reconocimiento	Número de péptidos reconocidos	% de Reconocimiento
<b>Vietnam 1203 2004</b>	189	144	76	124	66

Tomando en conjunto los resultados, podemos concluir que el aumento en el título de anticuerpos en los sueros adyuvados con el ODN 504 se compone por un lado, por anticuerpos generados hacia los mismos epitopes que la vacuna sola y por otro lado por anticuerpos que reconocen otros epitopes que no son reconocidos por la vacuna sola. En consecuencia, es lógico pensar que la inmunización en presencia del ODN 504 podría reconocer diferentes antígenos relacionados o no (sub-tipos de virus) que varían cada año debido a la tasa de mutación que presenta la Hemaglutinina con la finalidad de evadir la respuesta inmunológica de memoria. De esta manera la protección contra cepas circulantes de cada nueva estación sería mayor con vacunas adyuvadas con el ODN 504.

Otro de los motivos por los cuales la vacuna de Influenza debe ser mejorada es debido a la baja eficiencia que posee en las personas ancianas, en parte debido a la reducida respuesta inmune que presenta esta población frente al virus de Influenza. Las personas ancianas (particularmente aquellas con enfermedades cardíacas o respiratorias) presentan el mayor riesgo de morbilidad y mortalidad asociados con epidemias del virus Influenza tipo A o B durante el invierno (159, 160). Aproximadamente el 90% de las muertes relacionadas al virus de Influenza en países en desarrollo ocurre en personas mayores de 65 años de edad (159, 161).

Encontrar un adyuvante que aumente y mejore la respuesta hacia las vacunas comerciales de influenza en esta población sería de gran importancia.

El siguiente objetivo planteado por nosotros fue el de evaluar la acción del ODN 504 en ratas ancianas junto a la vacuna comercial Inflexal<sup>®</sup> V Berna.

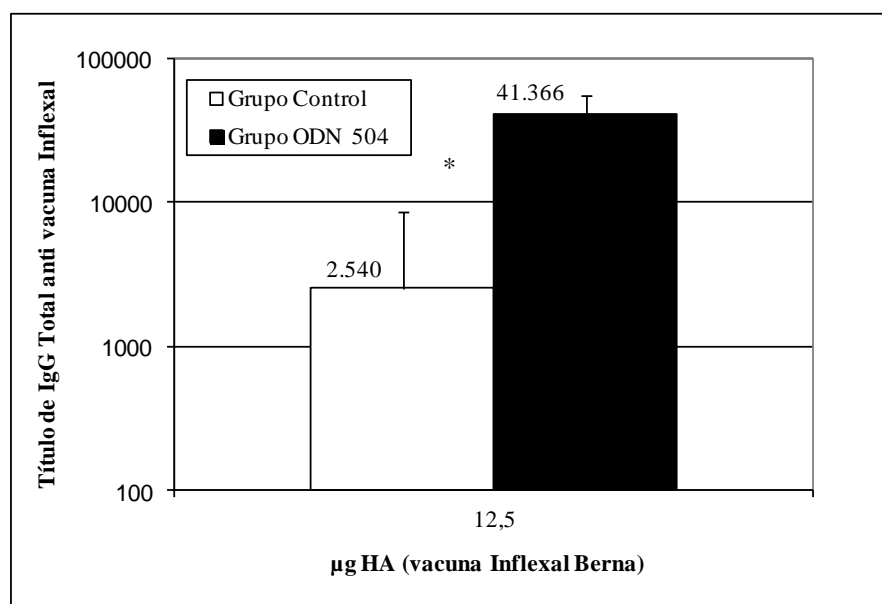
### **Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial virosomal de Influenza (Inflexal<sup>®</sup> V Berna) en ratas ancianas de la especie Sprague-Dawley.**

Para este estudio se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 20 y 22 meses de edad. Los animales fueron inmunizados con una dosis de 12.5µg de HA de la vacuna comercial Inflexal<sup>®</sup> V Berna en ausencia (grupo control) y en presencia del adyuvante ODN 504 (grupo ODN 504). El esquema de inmunización empleado fue el mismo al aplicado en las ratas jóvenes adultas.

Los resultados obtenidos en las ratas ancianas reflejaron una clara disminución de la respuesta inmune hacia la vacuna comercial de Influenza, en conformidad con la disminución de la respuesta inmunológica descrita en humanos (162b). Sin embargo, la adición del ODN 504 a la vacuna Inflexal incrementó el título de anticuerpos específicos aproximadamente 16 veces (41366 vs 2540) gráfico F7.

Además, la respuesta generada en estos animales en presencia del adyuvante es aproximadamente 6 (seis) veces superior al título de anticuerpos generado por los animales jóvenes inmunizados con la vacuna sin el oligonucleótido 504 (41366 vs 7167).

**Gráfico F7. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna Inflexal® V Berna en ratas ancianas de la cepa Sprague-Dawley.**

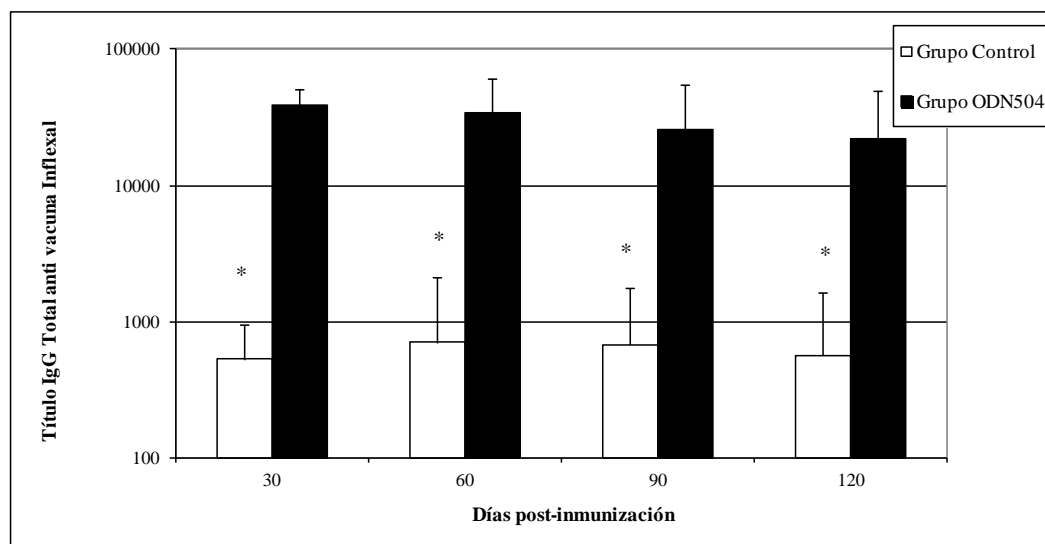


Ratas de la cepa Sprague- Dawley (8 por grupo) de 20 a 22 meses de edad, fueron inmunizados intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V (Berna Biotech Ltd. Switzerland) conteniendo 12.5µg de HA en ausencia (Grupo Control) o presencia de 50 µg de ODN 504 (Grupo ODN 504) por animal. Cada barra representa el promedio + el desvío estándar de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 3 (tres) experimentos independientes a 30 días post-inmunización. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

Por otro lado, también observamos una gran dispersión en los títulos de anticuerpos (desde 200 a 25600) de las ratas ancianas que no recibieron el adyuvante.

La evaluación de la respuesta de anticuerpos a largo plazo en estos animales indicó que la misma permaneció constante durante el período de estudio, gráfico F8.

**Gráfico F8. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna Inflexal V Berna en ratas ancianas de la cepa.**

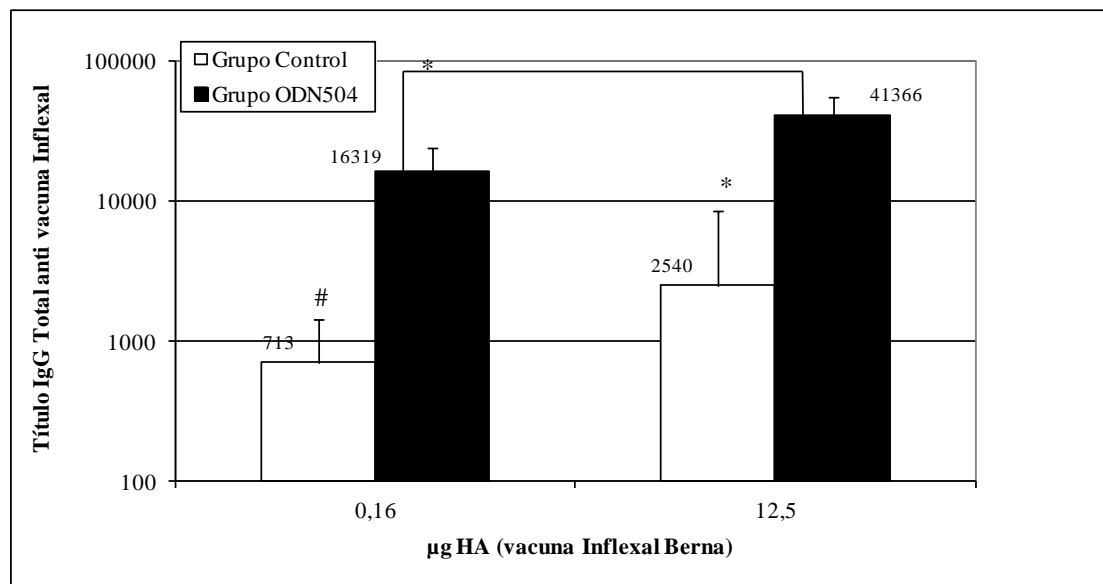


Ratas de la cepa Sprague- Dawley (8 por grupo) de 20 a 22 meses de edad, fueron inmunizadas intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V (Berna Biotech Ltd. witzerland) conteniendo 12.5µg de HA en ausencia (Grupo Control) o presencia de 50 µg de ODN 504 (Grupo ODN 504) por animal. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el desvío estandar de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 2 (dos) experimentos independientes a diferentes días post-inmunización: 30, 60, 90 y 120. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto con respecto al grupo control.

Además de la dosis de 12.5µg. de HA, evaluamos la respuesta de anticuerpos en estos animales con la dosis de 0.16µg. de Hemaglutinina de la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V, en ausencia (Grupo Control) y en presencia del adyuvante ODN 504 (Grupo ODN 504). Luego de un mes de haber realizado la inmunización se determinó el título de anticuerpos de clase IgG en el suero de los animales, gráfico F9.

Se puede observar que a diferencia de los animales jóvenes en donde a partir de los 0.16µg no se observó un incremento en la respuesta en presencia del ODN 504, en las ratas ancianas sí, observándose una claro aumento de la respuesta en función de la dosis en presencia del adyuvante.

**Gráfico F9. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna Inflexal® V Berna en ratas ancianas de la cepa Sprague-Dawley.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (8 por grupo) de 20 a 22 meses de edad, fueron inmunizadas intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V (Berna Biotech Ltd. Switzerland) conteniendo 0.16µg y 12.5 de HA en ausencia (Grupo Control) o presencia de 50 µg. de ODN 504 (Grupo ODN 504) por animal. Cada barra representa el promedio + el desvío estándar de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 2 (dos) experimentos independientes a los 30 días post-inmunización. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ), el # ( $p < 0,05$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Posiblemente el estado de inmunodeficiencia que se encuentra en los animales viejos hace que requiera más antígeno para generar una respuesta de anticuerpos elevada.

No se pudo testear dosis superiores, debido a que se excedía el volumen de inoculación en estos animales

Hasta aquí, la acción adyuvante del ODN 504 se manifestó junto a la vacuna virosomal Inflexal®, tanto en ratas jóvenes adultos como en ancianas de la cepa Sprague-Dawley.

Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante la técnica ELISA desarrollado en nuestro laboratorio, el cual determina el título de anticuerpos específicos de clase IgG hacia la vacuna que fue utilizada como fuente de antígeno. Sin embargo, esta metodología no determina la presencia de anticuerpos neutralizantes.

El método tradicional que se utiliza para determinar si la muestra de interés presenta anticuerpos neutralizantes específicos anti-Hemaglutinina se realiza mediante un ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA o HIA por sus siglas en inglés hemagglutination-inhibition antibodies).

En consecuencia, el siguiente objetivo consistió en determinar el título de anticuerpos mediante la técnica de IHA en los sueros de los animales inmunizados con la vacuna Inflexal® de Berna en ausencia y en presencia del adyuvante ODN 504.

**Determinación del Título de anticuerpos inhibitorios de la hemaglutinación (IHA) en sueros provenientes de ratas jóvenes y ancianas de la cepa Sprague-Dawley inmunizados con la vacuna Inflexal® V Berna en ausencia y en presencia del adyuvante ODN 504.**

La determinación de los títulos por esta metodología (IHA) en humanos permite determinar si un individuo se encuentra protegido hacia una específica cepa viral, de forma tal que si el título de IHA es igual o superior a 40 (cuarenta) se considera al individuo protegido (144).

Para llevar a cabo este ensayo se realizó un pool de sueros proveniente de animales jóvenes adultos inmunizados con la dosis de 12.5µg HA de la vacuna Inflexal® V Berna, en ausencia del ODN504 (Grupo Control) y 0.16µg HA en presencia del ODN 504 (Grupo ODN 504): En ratas ancianas se utilizó un pool de sueros de animales inmunizados con 12.5µg HA en ausencia (Grupo Control) y en presencia del ODN 504 (Grupo ODN 504). Los datos fueron analizados comparando los valores de los títulos obtenidos para cada una de las cepas virales en ausencia y en presencia del adyuvante.

A continuación se muestran en la tabla F5 los resultados de IHA para cada una de las cepas virales incluidas en la vacuna comercial.

**Tabla F5: Determinación del título de anticuerpos por IHA en ausencia y en presencia del ODN 504 en ratas jóvenes y ancianas, para cada una de las cepas virales incluidas en la vacuna Inflexal V Berna.**

		Grupo Control			Grupo ODN 504		
		Antígenos de Referencia			Antígenos de Referencia		
		Caledonia (H1N1) A/C/20/99	Moscow (H3N2) A/M/10/99	Schiuan (B)/379/99	Caledonia (H1N1) A/C/20/99	Moscow (H3N2) A/M/10/99	Schiuan (B)/379/99
Sueros	Ratas jóvenes adultas						
	Pre- vacunación	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Post- vacunación	21±1 <sup>a</sup>	64±12	10±1	164±24*	540±47*	76±11*
	Ratas ancianas						
	Pre- vacunación	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Post- vacunación	34±3	26±3	18±2	42±4	146±12*	21±2
Sueros de Referencia:		320±12	853±35	325±22			

Caracterización antigénica de las cepas de virus de Influenza incluídas en la vacuna realizada por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), con el WHO Influenza Reagent Kit distribuido por la OMS. Los antisueros específicos fueron producidos en hurones en el Centro Internacional de Referencia para la Vigilancia de Influenza de las Américas ubicado en el Centres for Disease Control and Prevention de Atlanta, EEUU (CDC). Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley, jóvenes adultas (6-8 semanas) y ancianas (20-22 meses) inmunizados intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal® V Berna. El suero de las ratas adultas jóvenes proviene de 3 pools diferentes de 10 animales cada uno inmunizados con 12.5µg HA (Suero Control) o con 0.16µgHA más 50µg ODN 504 (Grupo ODN504). El suero de las ratas ancianas proviene de 2 pools de 8 animales cada uno inmunizados con la dosis de 12.5µg HA en ausencia del ODN504 (Grupo Control) y en presencia del ODN 504 (Grupo ODN 504). Los títulos se expresan como la recíproca de cada dilución. <sup>a</sup> El valor indica el promedio de los títulos de 5 ensayos independientes ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba t de Student con respecto al grupo control.

Como se observa en la tabla F5, en todos los casos, ya sean en las ratas jóvenes o ancianas, el título de IHA antes de llevar a cabo la inmunización (pre-vacunación) fué menor a 10 (diez).

En el grupo ODN 504 de las ratas jóvenes adultas se puede observar un aumento en el título de IHA de aproximadamente 3 (tres) diluciones al medio para cada una de las cepas vacunales con respecto a los animales que no recibieron el adyuvante. Por ejemplo en el grupo control, el título de IHA para la cepa New Caledonia A/C/2099 (H1N1) es de  $21 \pm 1$  y el promedio del título para la misma cepa en el grupo ODN 504 fue de  $164 \pm 24$ . Similares resultados encontramos con las cepas Moscow A/M/10/99 (H3N2) y B/Schiuan /379/99. Además, los valores de los títulos para cada una de las cepas en el grupo ODN 504 estuvieron en el orden de los títulos presentados por los sueros de referencia, a excepción de la cepa B/Schiuan /379/99.

Es notable observar que en el grupo control la única cepa que reflejó un aumento en el título de IHA en aproximadamente 3 (tres) diluciones (al medio) fue la cepa Moscow (H3N2).

Cuando analizamos en los animales jóvenes el título de IgG Total anti la vacuna Inflexal<sup>®</sup> en esta dosis (gráfico F1), se observó un aumento aproximado de 13 (trece) veces en los animales que recibieron el ODN 504 con respecto a los controles (97500 vs. 7300). Este aumento en el título de IgG total anti-vacuna se evidenció en un aumento en el título de IHA para cada una de las cepas virales incluidas en la vacuna en al menos 3 (tres) diluciones (al medio). Recordemos, que la principal diferencia entre ambas metodologías es la especificidad de la técnica que presenta la IHA hacia epitopes neutralizantes de una determinada Hemaglutinina.

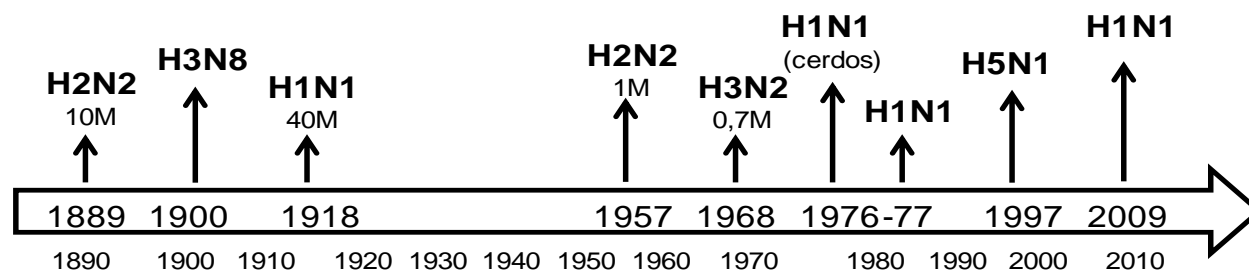
Diferentes resultados encontramos en las ratas ancianas, donde solo se observó un aumento en el título de IHA con la cepa Moscow A/M/10/99 (H3N2). A pesar que en estos animales también se reflejó un aumento aproximado de 15 (quince) veces en el título de IgG Total anti-vacuna Inflexal con respecto al grupo control (gráfico F7, 41366 vs. 2540), solo observamos un aumento entre 2 (dos) y 3 (tres) diluciones (al medio) para la cepa Moscow en el grupo ODN 504.

El estudio cualitativo de los anticuerpos generados en presencia del ODN 504 evidenció un aumento de la diversidad antigénica. Con el objetivo de evaluar si este aumento de la diversidad corresponde a la generación de anticuerpos neutralizantes, se determinó el título de anticuerpos por IHA hacia cepas diferentes a las incluidas en la vacuna comercial.

En este sentido, revisando la bibliografía nos encontramos que en las pandemias de 1957-58 (“gripe Asiática”) y 1968-69 (“gripe de Hong Kong”) hubo diferentes recombinaciones de virus humanos y



animales (162c). En la pandemia de 1957 la infección por el virus H2N2 y la combinación con otro virus H1N1 produjeron un nuevo virus H2N2 (origen de la pandemia). Este virus circuló hasta 1968, año en el que fue reemplazado por el virus H3N2 de Hong Kong, el cual en la actualidad aún circula y comparte cinco genes con el virus H1N1 que originó la pandemia de 1918 (162c).



Aparición relativa de cada cepa de virus de Influenza A, a lo largo del tiempo. Debajode algunos de los subtipos, se indica el número de personas afectadas en cada evento pandémico por ejemplo 10M (10 millones).

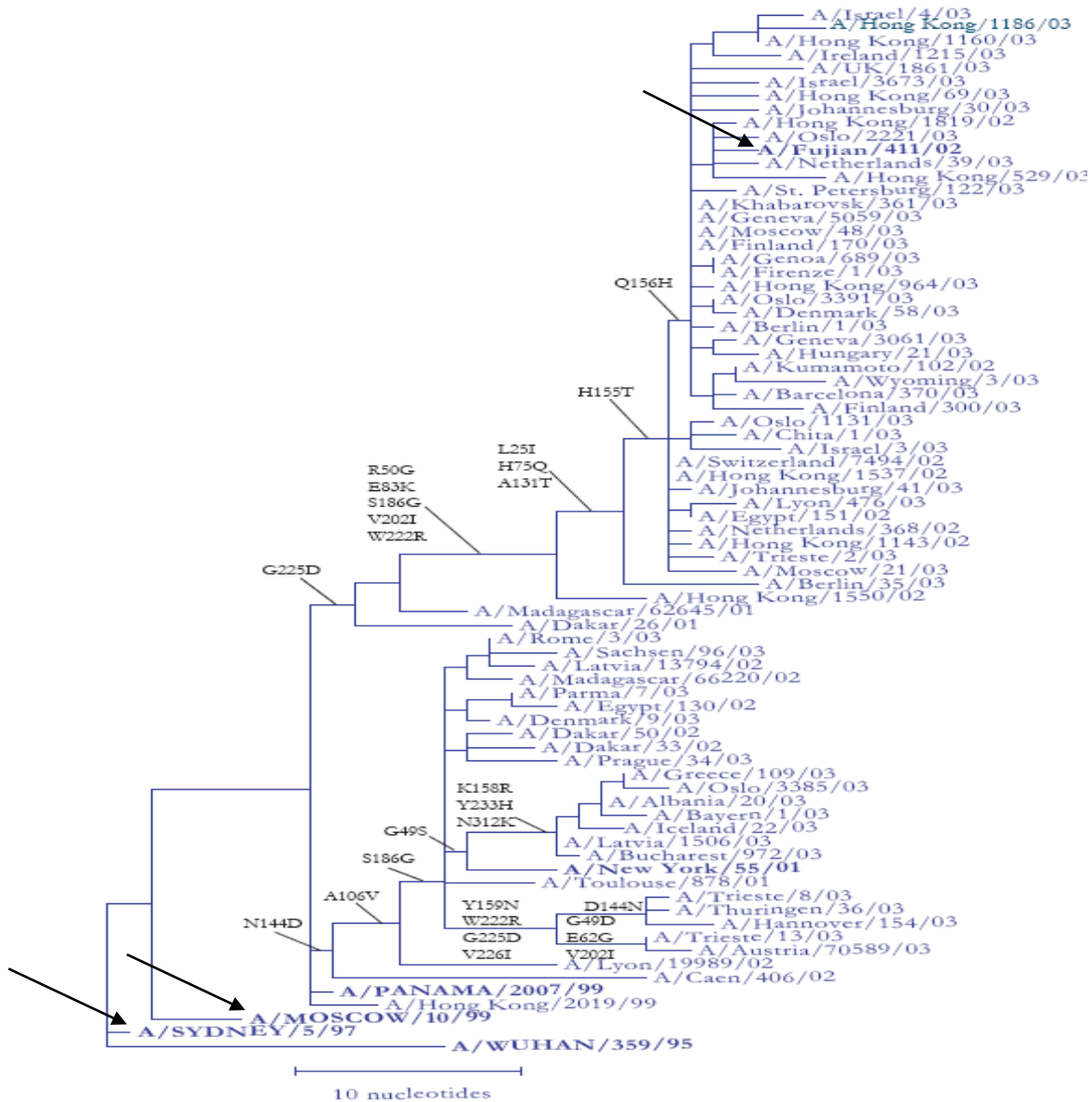
Nos pareció interesante elegir una cepa H3N2 no relacionada a la cepa vacunal, por lo que utilizamos la cepa A/Fujian/411/2002, testada previamente en el ensayo de binding en las membranas de celulosa.

Cuando una cepa se distingue antigénicamente a otra se dice que las cepas “no son relacionadas” y la diferencia en el título de HIA con el suero de referencia corresponde como mínimo a 2 (dos) o más diluciones al medio (162). Por ejemplo en el caso de Moscow versus Fujian la diferencia en el título de HIA es de 3 (tres) diluciones, en consecuencia ambas cepas no están relacionadas.

		Antígeno de Referencia	
		Moscow A/M/10/99	Fujian A/F/411/02
Suero de Referencia	Moscow A/M/10/99	1280	160
	Fujian A/F/411/02	160	1280

Caracterización antigénica de Influenza realizada por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (HIA), con el WHO Influenza Reagent Kit distribuido por la OMS. Los antisueros específicos fueron producidos en hurones en el Centro Internacional de Referencia para la Vigilancia de Influenza de las Américas ubicado en el Centres for Disease Control and Prevention de Atlanta, EEUU (CDC). Los títulos se expresan como la recíproca de la dilución

A continuación se puede observar la ubicación de las cepas utilizadas en el test de IHA (tabla F6) y su distancia filogenética basada en la secuencia lineal de nucleótidos



Con el objetivo de corroborar si lo observado cualitativamente en el ensayo de binding para la cepa Fujian se refleja en un aumento en el título de IHA, se determinó el título (por IHA) para esta cepa. Al mismo tiempo, se incluyó en este estudio una cepa relacionada antigénicamente a la cepa Moscow, la cepa Sydney A/S/5/97.

**Tabla F6: Determinación del título de anticuerpos por IHA hacia cepas H3N2 no incluidas en la vacuna Inflexal.**

		Grupo Control		Grupo ODN 504	
		Antígenos de Referencia		Antígenos de Referencia	
		Sidney (H3N2) A/S/5/97. Relacionada <sup>#</sup> (a Moscow)	Fujian (H3N2) A/F/411/02. No Relacionada <sup>+</sup> (a Moscow)	Sidney (H3N2) A/S/5/97. Relacionada <sup>#</sup> (a Moscow)	Fujian (H3N2) A/F/411/02. No Relacionada <sup>+</sup> (a Moscow)
Sueros	Ratas jóvenes adultas				
	Pre- vacunación	<10	<10	<10	<10
	Post- vacunación	10	42±5 <sup>a</sup>	84±2*	326±14*
	Ratas ancianas				
	Pre- vacunación	<10	<10	<10	<10
	Post- vacunación	22±2	<10	21±13	84±4*
Sueros de Referencia:		640±8	1305±14		

Caracterización antigénica de las cepas de Influenza Sidney A/S/5/97 y Fujian A/F/411/02 Relacionada (#) y No Relacionada (+) respectivamente a la cepa Moscow A/M/10/99 (incluida en la vacuna), por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (HIA), con el WHO Influenza Reagent Kit distribuido por la OMS. Los antisueros específicos (Sueros de Referencia) fueron producidos en hurones en el Centro Internacional de Referencia para la Vigilancia de Influenza de las Américas ubicado en el Centers for Disease Control and Prevention de Atlanta, EEUU (CDC). Se evaluó el suero de ratas de la cepa Sprague-Dawley jóvenes (6-8 semanas) y ancianas (20-22 meses) inmunizados intramuscularmente con la vacuna comercial Inflexal V Berna. El suero de las ratas adultas jóvenes proviene de 3 pools diferentes de 10 animales cada uno inmunizados con 12.5µg HA (Suero Control) o con 0.16µg HA más 50µg ODN 504 (Grupo ODN504). El suero de las ratas ancianas proviene de 2 pools de 8 animales cada uno inmunizados con la dosis de 12.5µg HA en ausencia del ODN504 (Grupo Control) y en presencia del ODN 504 (Grupo ODN 504). <sup>a</sup> El valor indica el promedio de los títulos de 5 ensayos realizados independientemente ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba t de Student con respecto al grupo control.

Los resultados obtenidos en los animales jóvenes muestran que el agregado del ODN 504 a la vacuna comercial aumentó el título de IHA para ambas cepas, la relacionada (Sydney) y no relacionada (Fujian) a la cepa vacunal en al menos 3(tres) diluciones cuando se lo compara con el grupo control.

Un resultado particular se observa en la respuesta hacia la cepa relacionada (Sydney) donde el título (post-vacunación) es menor a lo esperado en ambos grupos controles (jóvenes y ancianas) y también en las que recibieron el ODN 504 si lo comparamos con la cepa no relacionada (Fujian). Nosotros pensamos que el antígeno estandarizado de la Hemaglutinina de la cepa Sydney (WHO-Center for Influenza) podría haberse encontrado parcialmente desnaturalizado, por lo tanto el reconocimiento de este con los anticuerpos se vió afectado. Esta observación se correlaciona en el título obtenido con el suero de referencia (640) el cual fue muy bajo con respecto a lo obtenido históricamente con esta cepa.

Hasta aquí, se demuestra la acción adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna virosomal Inflexal<sup>®</sup> V Berna en ratas jóvenes adultos como así también en ancianas cuando se evaluó el título de anticuerpos de clase IgG en el suero de los animales inmunizados.

En cuanto a la determinación del título por IHA, en animales jóvenes se observó un aumento para todas las cepas virales estudiadas, vacunales y relacionadas o no a la cepa H3N2. Estos resultados sugieren que una vacuna del virus de influenza adyuvada con el ODN 504 puede ser útil para presentar una respuesta protectora hacia cepas de virus emergentes por “deriva génica”.

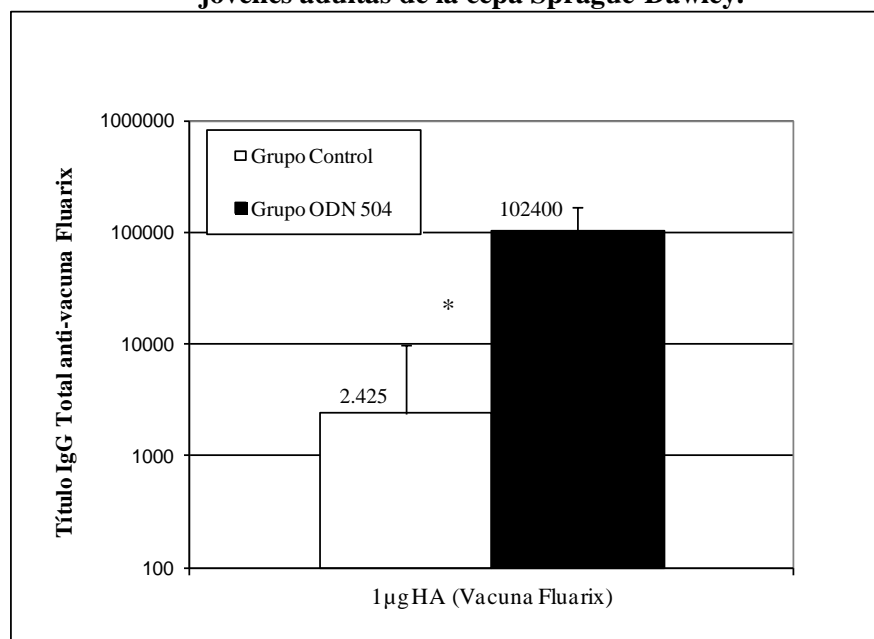
Por otro lado, la formulación de la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V Berna es virosomal, los virosomas tienen la particularidad de conservar la capacidad de exhibir las proteínas Hemaglutinina y Neuroaminidasa virales en su estado nativo, y en consecuencia los convierte en adyuvantes altamente efectivos. Debido a que los resultados obtenidos se realizaron utilizando la vacuna virosomal Inflexal<sup>®</sup>, fue de nuestro interés evaluar si la estructura molecular del antígeno condiciona la acción adyuvante del ODN 504, por lo tanto el siguiente objetivo consistió en evaluar la acción adyuvante del OND504 junto a la vacuna comercial Fluarix<sup>®</sup>, la cual se encuentra formulada con virus inactivado.

### Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna comercial Fluarix<sup>®</sup> de laboratorios GlaxoSmithkline (GSK) en ratas jóvenes adultas de la especie Sprague-Dawley.

En este estudio utilizamos la vacuna comercial Fluarix<sup>®</sup> (GSK) temporada 2004 Hemisferio Sur. Las cepas incluidas en la vacuna fueron las siguientes: A/New Caledonia 20/99 (H1N1); A/California/7/2004 (H3N2) y B/Malasia/2506/2004.

Se inmunizaron 2 (dos) grupos de 20 (veinte) animales adultos jóvenes, con una dosis conteniendo 1 µg Hemaglutinina en ausencia (Grupo Control) o en presencia de 50 µg ODN 504/animal (Grupo ODN 504). Todos los animales fueron inmunizados con una única dosis y luego de un mes se determinó el título de anticuerpos mediante la técnica ELISA en el suero de los animales inmunizados, gráfico F10.

**Gráfico F10: Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna Fluarix<sup>®</sup> (GSK) en ratas jóvenes adultas de la cepa Sprague-Dawley.**



Ratas de la cepa Sprague-Dawley (6 por grupo) fueron inmunizadas intramuscularmente con la vacuna comercial Fluarix<sup>®</sup> (GSK) conteniendo 1 µg de HA en ausencia (Grupo Control) o presencia de 50 µg. de ODN 504 (Grupo ODN 504) por animal. Cada barra representa el promedio ± el desvío estándar de los títulos de IgG total específica anti la vacuna comercial de 2 (dos) experimentos independientes a los 30 días post-inmunización. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test con respecto al grupo control.

La respuesta de anticuerpos anti Fluarix<sup>®</sup> fue significativamente superior en el grupo que recibió el ODN 504.

Por lo tanto, el ODN 504 es efectivo en ambos tipos de formulaciones vacunales, virosomal y a virus entero inactivado, las cuales en la actualidad representan las principales clases de vacunas comerciales del virus de Influenza.

El siguiente paso, consistió en determinar el título anticuerpos neutralizantes específicos hacia la Hemaglutinina mediante la técnica de IHA. Para ello, se realizó un pool de los sueros de cada grupo experimental (inmunizados con 1µg de HA), y se determinó el título de IHA para la cepa vacunal Caledonia A/C/20/99 (H1N1).

Además, teniendo como antecedente, el reconocimiento de una mayor diversidad antigénica por parte de los animales inmunizados con el ODN 504 junto a la vacuna Inflexal<sup>®</sup>, se determinó el título de IHA hacia una cepa no relacionada (Moscow) y relacionada (Fujian) a la cepa vacunal A/California/7/2004 (H3N2).

Como se puede observar en la tabla F7, nuevamente el agregado del ODN 504 aumentó el título de IHA en 3 (tres) diluciones al medio, tanto para cepa vacunal (Caledonia) como para las cepas no incluidas en la vacuna.

**Tabla F7. Evaluación de la actividad adyuvante del ODN 504 junto a la vacuna Fluarix<sup>®</sup> (GSK) en ratas jóvenes adultas de la cepa Sprague-Dawley.**

		Grupo Control			Grupo ODN 504		
		Antígenos de Referencia			Antígenos de Referencia		
		New Caledonia (H1N1) A/C/20/99.	Fujian (H3N2) A/F/411/02. Relacionada <sup>#</sup> (a California)	Moscow (H3N2) A/M/10/99. No Relacionada <sup>+</sup> (a California)	New Caledonia (H1N1) A/C/20/99.	Fujian (H3N2) A/F/411/02. Relacionada <sup>#</sup> (a California)	Moscow (H3N2) A/M/10/99. No Relacionada <sup>+</sup> (a California)
Sueros	Ratas jóvenes adultas						
	Pre-vacunación	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Post-vacunación	24±3 <sup>a</sup>	12±2	10±0	168±4*	86±4*	92±4*
	Sueros de Referencia	350±4	1315±4	1295±6			

Caracterización antigénica de las cepas de Influenza New Caledonia A/C/20/99 (incluida en la vacuna), Relacionada (#) y No Relacionada (+) respectivamente a la cepa A/California/7/2004 (H3N2) (incluida en la vacuna), por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA), con el WHO Influenza Reagent Kit distribuido por la OMS. Los antisueros específicos fueron producidos en hurones en el Centro Internacional de Referencia para la Vigilancia de Influenza de las Américas ubicado en el Centers for Disease Control and Prevention de Atlanta, EEUU (CDC). Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley jóvenes (6-8 semanas) inmunizadas por vía intramuscular con la vacuna comercial Fluarix (GSK). El suero de los animales proviene de 2 pools diferentes de 6 animales cada uno inmunizados con 1µg HA (Grupo Control) o más 50µg ODN 504 (Grupo ODN504). Los títulos se expresan como la recíproca de cada dilución. <sup>a</sup> El valor indica el promedio de los títulos de 5 ensayos realizados independientemente ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) por la prueba t de Student con respecto al grupo control.

Vinculando estos resultados con los obtenidos con la vacuna virosomal Inflexal<sup>®</sup> V, podemos concluir que el adyuvante ODN 504 incrementa la respuesta tanto cuantitativamente como también en forma cualitativa mediante el reconocimiento (potencial) de “nuevos epítopes” hacia cepas del virus de influenza.

En resumen, en los animales jóvenes, independientemente de la formulación de la vacuna, el reconocimiento de una mayor diversidad antigénica producida por el ODN 504 permite el reconocimiento específico de cepas relacionadas o no a la cepa H3N2 incluida en la vacuna Fluarix<sup>®</sup>.

Este resultado nos permitiría pensar que la inoculación de la vacuna comercial en presencia del ODN 504 podría reconocer antígenos relacionados (sub-tipos de virus) que varían cada año debido a la tasa de mutación que presenta la Hemaglutinina con la finalidad de evadir la respuesta inmunológica. De esta manera la protección contra cepas circulantes de cada nueva estación sería mayor con vacunas adyuvadas con el ODN 504.

## Capítulo G.

### Evaluación de la acción del ODN 504 en la memoria inmunológica.

La memoria inmunológica es una característica especial que presenta la respuesta adaptativa del sistema inmune.

En la respuesta secundaria se activan linfocitos B de memoria que pueden o no, generar un nuevo centro germinal. Se caracterizan por la expresión de CD27<sup>+</sup> y la mayoría se encuentran en un estado de reposo.

Las células B de memoria sobreviven en los órganos linfoides secundarios en ausencia del antígeno durante largos periodos (163), por ejemplo en individuos vacunados contra la viruela se detectan niveles protectivos de anticuerpos circulantes 60 años después de la inmunización.

Ahora bien, si la vida media de los anticuerpos IgG es de aproximadamente 20 días ¿Cómo se mantiene activa la producción de anticuerpos por décadas?

En el año 2002 Lanzavecchia y colaboradores (164) presentaron un mecanismo alternativo que podría garantizar la continua proliferación y diferenciación de las células de memoria B, independientemente de la persistencia del antígeno, la cual denominó “memoria serológica a largo plazo”. Este grupo demostró que estímulos policlonales por moléculas PAMP's, como por ejemplo LPS u ODN's CpG, conducen a la proliferación y diferenciación de células B de memoria en ausencia de antígeno, activando a las células B via TLR-4 o TLR-9 respectivamente (165, 166).

Con el rol propuesto para los ODN's *PyNTTTTGT* como moléculas DAMP's, el siguiente objetivo propuesto por nosotros fue evaluar la actividad del ODN 504 en el mantenimiento de la “memoria inmunológica a largo plazo”.

Para ello, inmunizamos ratas de la cepa Sprague-Dawley con la vacuna de Hepatitis B proveniente de Laboratorios Cassará AgB<sup>®</sup>. Luego de un período de 10-12 meses aproximadamente post-inmunización, cuando el título de anticuerpos IgG específica (determinados mediante la técnica ELISA) disminuyó entre 4-5 diluciones al medio, se dividieron los animales en tres grupos experimentales: un grupo de animales recibió 4 dosis de 6mg cada una de ODN 504 en intervalos de 3 horas, otro grupo de animales recibió Soluciojn Fisiológica por vía sub-cutánea y por último un grupo de animales recibió un booster de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> (control positivo). Cinco días post última dosis, se determinó el número de células formadoras de anticuerpos (CFA) por la técnica de ELISPOT.

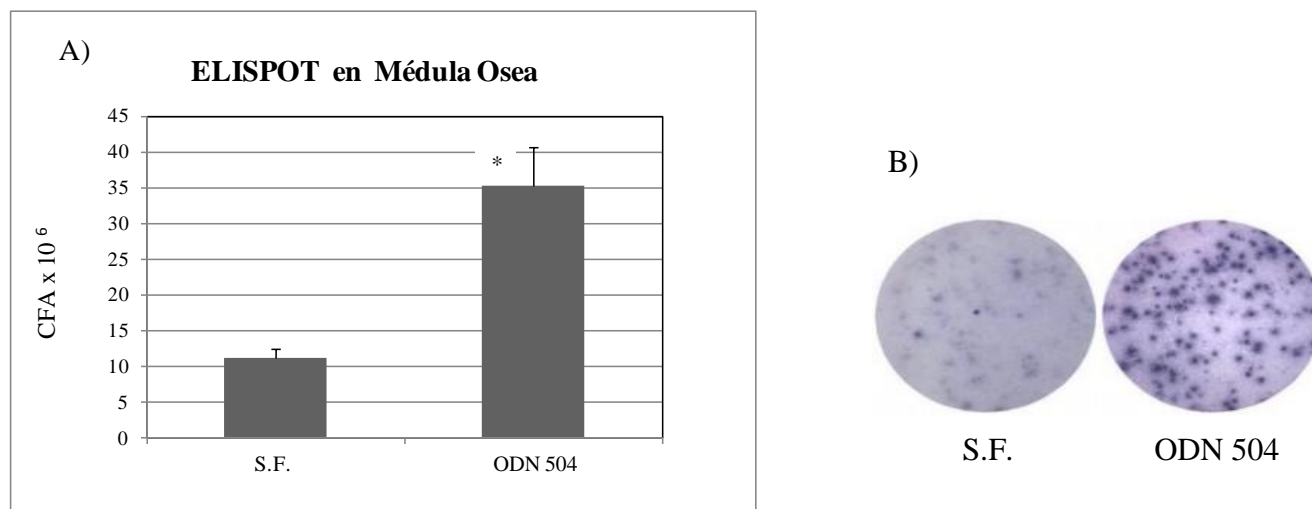


En mamíferos, luego de una inmunización sistémica u oral, la médula ósea (m.o.) es el principal sitio de producción de anticuerpos de la respuesta inmune secundaria (167, 168, 169). Si bien, la inducción de la respuesta inmune ocurre en tejidos linfoides (excepto en m.o.) una vez que las células están estimuladas migran desde los órganos linfoides secundarios a la m.o. (170, 171). En humanos, Mamani-Matsuda y colaboradores (172) demostraron que el bazo es el principal órgano reservorio de las células B de memoria específicas del virus vaccinia.

En función de lo expuesto, evaluamos el número de CFA en m.o. y en el bazo en todos los animales.

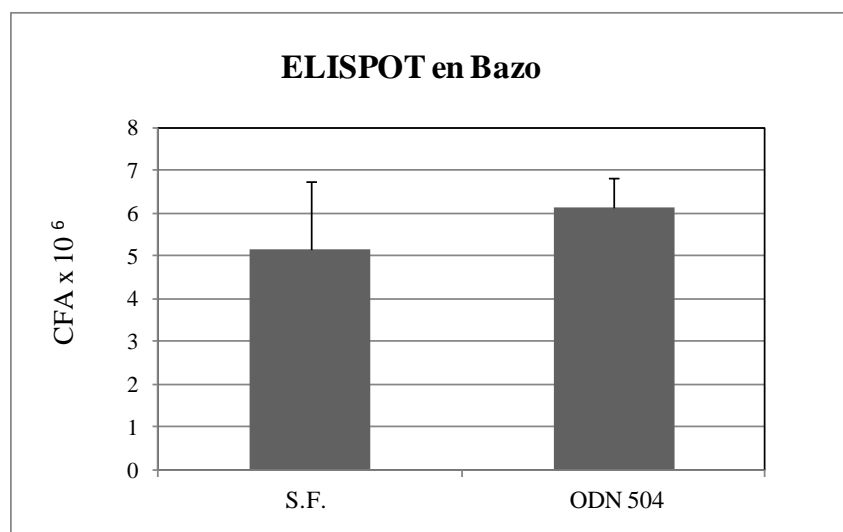
En el siguiente gráfico (G1) se puede observar un aumento del número de CFA en la m.o. de los animales que recibieron el ODN 504 con respecto a los que recibieron S.F.

**Gráfico G1. Células formadoras de anticuerpos específicas anti Hepatitis B en la médula ósea.**



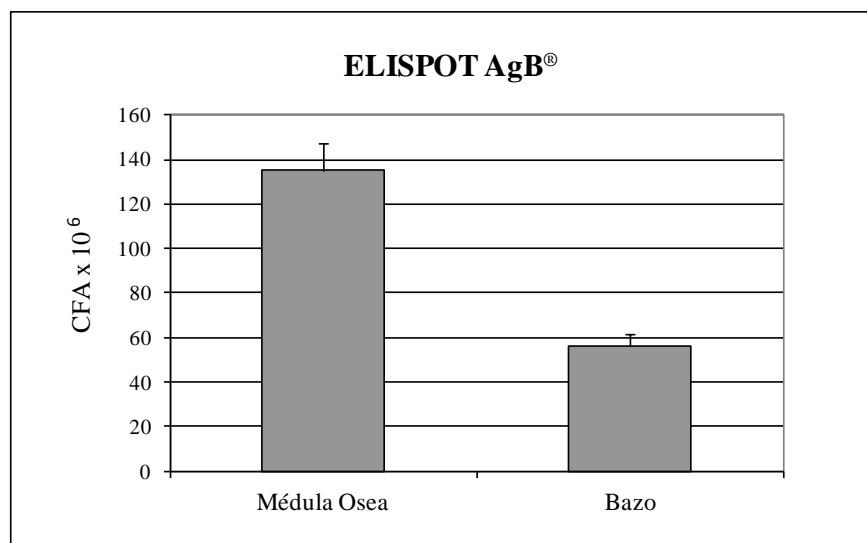
Ratas Sprague-Dawley (10 por grupo) inmunizadas con la vacuna de AgB<sup>®</sup> recibieron 10-12 meses post inmunización 4 dosis de 6mg c/u en intervalos de 3 horas del oligonucleótido 504 (ODN 504) o Solución Fisiológica (S.F). A los 5 días post-ultima dosis se sacrificaron los animales y se determinó el número de células formadoras (CFA) de anticuerpos específicos anti HBsAg en la médula ósea por la técnica de ELISPOT. A) Cada barra representa el promedio de CFA x 10<sup>6</sup> ± el desvío estándar de dos experimentos independientes B) Fotografía de los pocillos revelados por la técnica de ELISPOT. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Sin embargo, el número de CFA en el bazo se mantuvo constante en ambos grupos experimentales gráfico G2.

**Gráfico G2. Células formadoras de anticuerpos específicas anti HBsAg en el bazo.**

Ratas Sprague-Dawley (10 por grupo) inmunizadas con la vacuna de AgB<sup>®</sup> recibieron 10-12 meses post inmunización 4 dosis de 6mg c/u en intervalos de 3 horas del oligonucleótido 504 (ODN 504) o Solución Fisiológica (S.F). A los 5 días se determinó el número de células formadoras (CFA) de anticuerpos específicos anti Hepatitis B en el bazo por la técnica de ELISPOT. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el desvío estándar de dos experimentos independientes.

En los animales que recibieron la vacuna AgB<sup>®</sup>, como control positivo, el número de CFA aumentó significativamente, tanto en médula ósea como en el bazo.

**Gráfico G3. Células formadoras de anticuerpos en médula ósea y bazo en animales con un booster de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>.**

Ratas Sprague-Dawley (10 por grupo) inmunizadas con la vacuna de AgB<sup>®</sup> recibieron 10-12 meses post inmunización una segunda dosis (booster) con la vacuna comercial AgB<sup>®</sup>. A los 5 días se determinó el número de células formadoras (CFA) de anticuerpos específicos anti Hepatitis B en médula ósea y bazo por la técnica de ELISPOT. Cada barra representa el promedio  $\pm$  el desvío estándar de dos experimentos independientes.

Estos resultados indican que las células B de memoria pueden proliferar por un lado, en presencia del antígeno, y por otro lado por un estímulo policlonal (como lo que ocurrió en este caso).

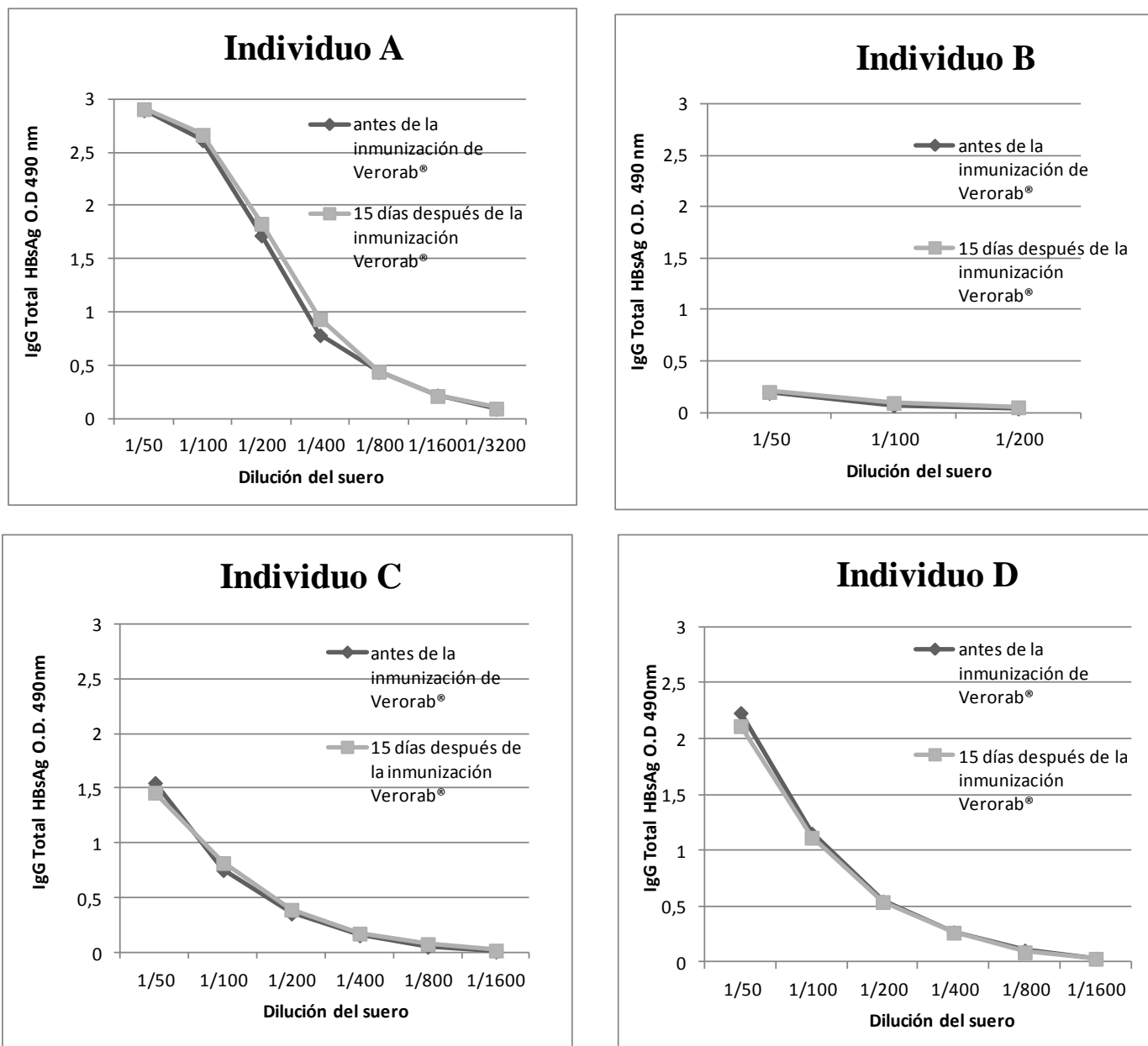
El hecho de que un booster con la vacuna comercial (AgB<sup>®</sup>) aumente el número de células formadoras de anticuerpos (CFA) tanto en m.o como en bazo, y con el ODN 504 solo se evidenció un aumento en m.o., podría significar que el oligonucleótido actúe específicamente sobre las células B de memoria que se encuentran en m.o. Mientras que el antígeno, estimula tanto a las células B de memoria que se encuentran en m.o como en el bazo o. También podría suceder que la presencia del antígeno estimule la migración de las células B de memoria desde m.o al bazo.

En este modelo de activación por estímulos policlonales (PAMP's o DAMP's) las células B de memoria producen *in vivo* niveles bajos de anticuerpos, proporcionales al aumento en la frecuencia de las células B de memoria específicas, de forma que todas las células de memoria B que responden a estos estímulos, teóricamente podrían mantener un nivel constante de células plasmáticas y anticuerpos en el suero de los individuos a lo largo de su vida.

Con el objetivo de evaluar la actividad del ODN 504 en la activación de las células B de memoria en humanos, determinamos los niveles de anticuerpos anti hepatitis B (HBsAg) en los sueros de los individuos que habían recibido una fracción de la vacuna comercial VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia del ODN 504 (capítulo E).

Mediante la técnica ELISA determinamos la presencia de anticuerpos de clase IgG específicos anti HBsAg y comparamos la respuesta en todos los individuos, antes (respuesta basal anti HBsAg) y después de recibir la vacuna VeroRab<sup>®</sup>, con o sin el agregado del ODN 504. Elegimos este antígeno debido a que todos los individuos habían recibido el esquema de inmunización convencional de Hepatitis B, grafico G4.

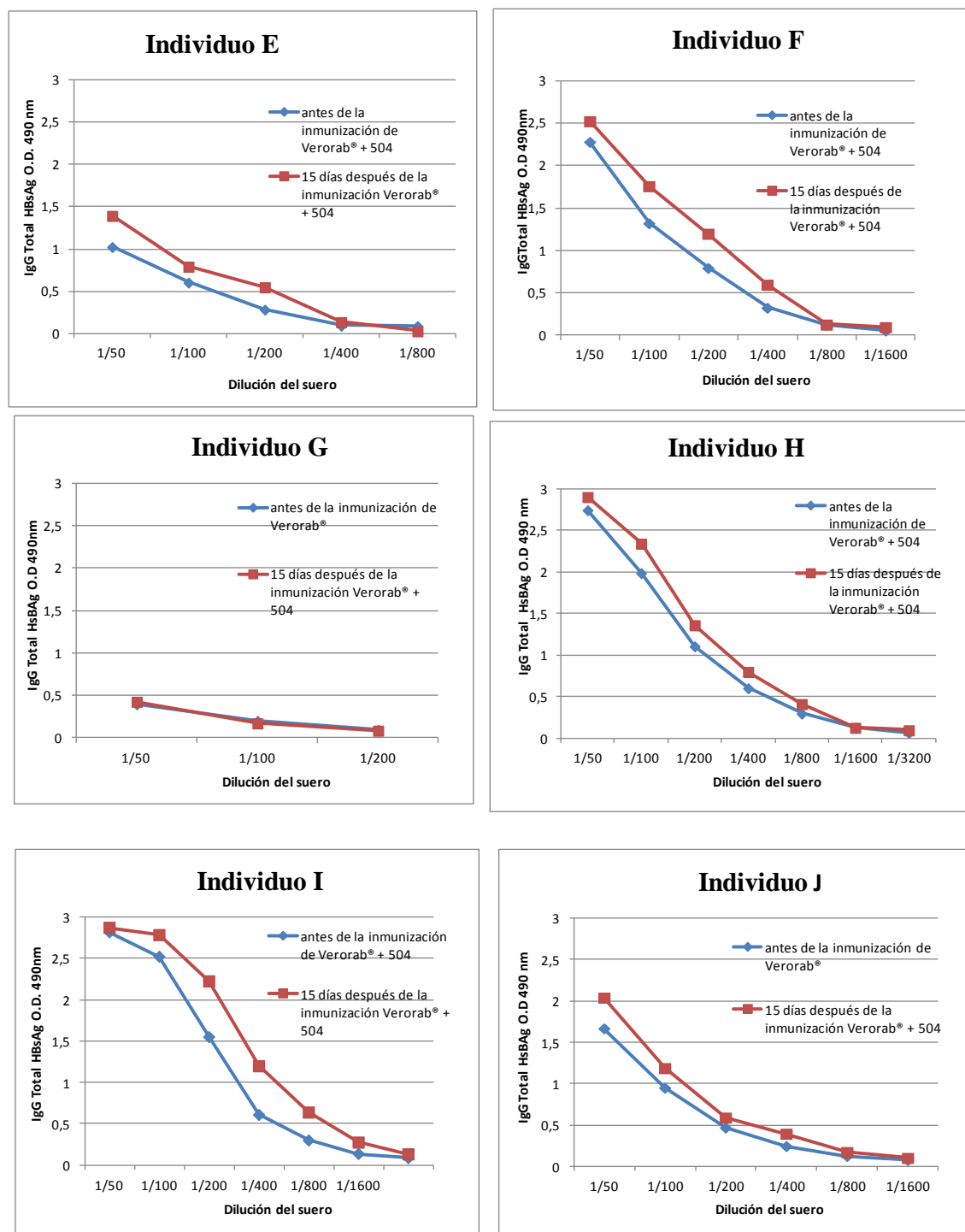
**Gráfico G4. Anticuerpos anti HBsAg en individuos inmunizados con la vacuna VeroRab® en ausencia del ODN 504 (Grupo Control).**



Evolución de la respuesta de anticuerpos de clase IgG total anti HBsAg en humanos voluntarios inmunizados con una dilución al quinto de la vacuna comercial VeroRab®. Las curvas representan la OD a 490nm mediante el método de ELISA en diferentes diluciones del suero antes y luego de 15 días de la inmunización de la 3<sup>era</sup> dosis de la vacuna VeroRab®.

Como se observa en un amplio rango de diluciones en suero, ninguno de los individuos aumentó los valores de OD anti HBsAg luego de la inmunización con la vacuna comercial VeroRab®. Sin embargo, resultados diferentes se observaron luego de la inmunización con la vacuna VeroRab® en presencia del ODN 504, gráfico G5.

**Gráfico G5. Anticuerpos anti HBsAg en individuos inmunizados con la vacuna VeroRab® en presencia del ODN 504 (Grupo ODN 504).**



Evolución de la respuesta de anticuerpos de clase IgG total anti HBsAg en humanos voluntarios inmunizados con una dilución al quinto de la vacuna comercial VeroRab® más 1mg del ODN 504. Las curvas representan la OD a 490nm determinada por el método de ELISA en diferentes diluciones del suero antes y luego de 15 días de la inmunización de la 3<sup>era</sup> dosis de la vacuna VeroRab® más el ODN 504.

Sólo en los individuos que recibieron la vacuna VeroRab<sup>®</sup> más el ODN 504 se evidenció un leve aumento en los niveles de anticuerpos anti HBsAg, a excepción del individuo G, este individuo particularmente presentó el valor más bajo de anticuerpos protectivos anti la vacuna rábica en este grupo experimental (capítuloE).

La sensibilidad a estímulos policlonales representa una característica fundamental de las células B de memoria humana. De esta manera, teóricamente, podría mantenerse un nivel constante de células plasmáticas y anticuerpos a lo largo de una vida humana.

## Capítulo H.

### Evaluación de la acción del ODN 504 en Sepsis y Shock Séptico.

La sepsis, el shock séptico y las secuelas adversas de la respuesta sistémica inflamatoria a la infección constituyen una de las causas más frecuentes de mortalidad en las unidades de cuidados intensivos no coronarias. En los últimos años se ha evidenciado un incremento tanto en la incidencia de la sepsis como en la mortalidad relacionada con ella, a pesar de los grandes avances en el conocimiento de su fisiopatología y en la tecnología de soporte vital del paciente (173).

Con la intención de unificar criterios, en 1992 la sociedad de cuidados intensivos (SCCM) definió y clasificó los diferentes estadios y trastornos asociados a la sepsis, tabla H1 (174).

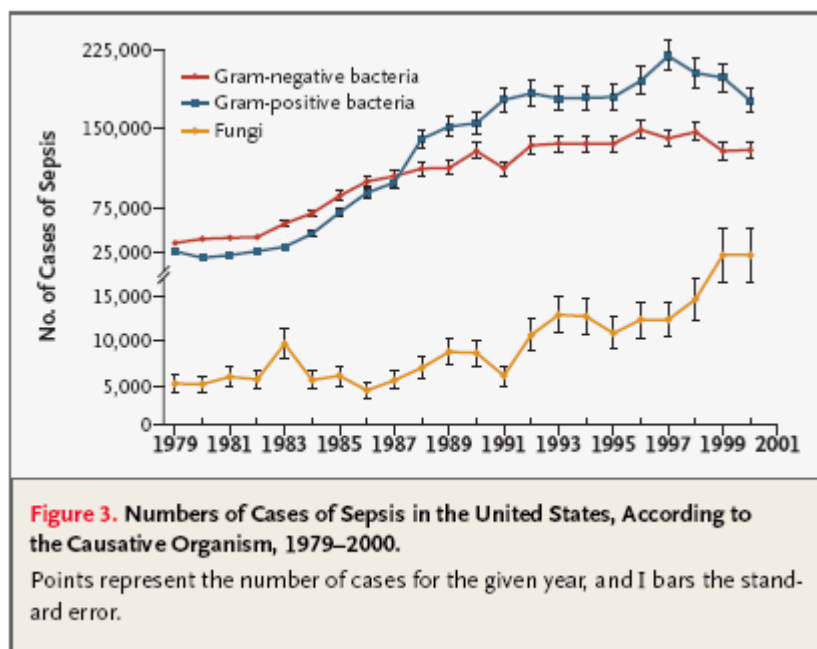
**Tabla H1: Definiciones de la Sepsis/SIRS y Shock Septico.**

Septicemia	Conjunto de situaciones clínicas en las que se encuentran microorganismos en la sangre. Este término es ambiguo y se recomienda su eliminación.
Síndrome de respuesta inflamatoria Sistémica (SIRS)	Su diagnóstico exige dos o más de las siguientes alteraciones: Temperatura $>38^{\circ}$ o $<36^{\circ}$ C; aumento en la frecuencia cardíaca y/o respiratoria; recuento leucocitario $>12000$ cel/mm <sup>3</sup> .
Sepsis	Respuesta sistémica a una infección originada por un microorganismo.
Sepsis grave	Sepsis asociada con disfunción orgánica. En este estadio el riesgo de muerte aumenta un 15-20% por cada órgano disfuncionante.
Shock Séptico	La falta de flujo sanguíneo lleva a trastornos en el metabolismo celular. El shock lleva a disfunción y falla multiorgánica, culminando en la muerte.

La sepsis comienza con la infección protagonizada por un microorganismo que invade al huésped atravesando sus barreras epiteliales (piel o mucosas).

En los últimos años un importante cambio se evidenció en cuanto al agente etiológico causante de la sepsis. Como se observa en la siguiente figura (H1), a partir del año 1987 el organismo predominante causante de la sepsis fueron las bacterias gram-positivas (175, 176).

Figura H1.



Esta figura fue producida por Greg S. Martin. Fuente N England J Med 2003; 348:1546-54 (176)

Una vez establecido el foco infeccioso si la respuesta inflamatoria del huésped es adecuada la infección se controla y los microorganismos o sus toxinas son eliminados o neutralizados. Sin embargo, si la respuesta es insuficiente, ésta se magnifica por mecanismos moleculares que la tornan excesiva e incontrolada y se afectan órganos distantes del foco infeccioso inicial. Estos mecanismos moleculares que teóricamente, deberían tener finalidad defensiva, ponen de manifiesto la imperfección de un sistema inmunitario que, en determinadas circunstancias, genera una respuesta contra el propio organismo.

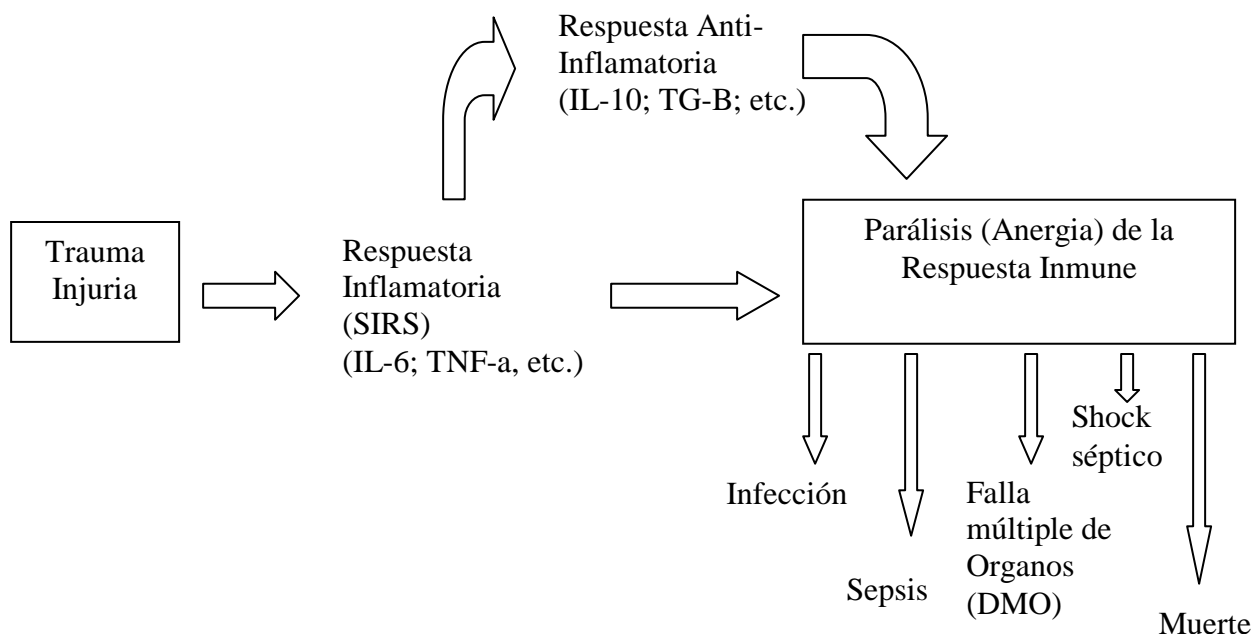
El sistema inmunológico opera con elementos celulares que interactúan entre sí utilizando mediadores y receptores químicos. Una de las familias de mediadores mejor conocidas son las citoquinas pro-inflamatorias (Factor de necrosis tumoral [TNF], Inteleuquina (o Citoquina) -1 [IL-1], Interleucina-6 [IL-6]), las cuales son liberadas a la circulación sanguínea y causan la activación de varias células, como neutrófilos, monocitos, macrófagos, plaquetas y células endoteliales. Así mismo, son también responsables de la activación de proteínas plasmáticas como por ejemplo de la: coagulación, fibrinólisis, complemento y mediadores lipídicos: eicosanoides (metabolitos del ácido araquidónico); factor activador de plaquetas (PAF); radicales de oxígeno y óxido nítrico (175).

Desde el punto de vista fisiopatológico la existencia de una respuesta orgánica compuesta de factores inmunológicos de signos contrarios es un interrogante planteado por muchos investigadores, en este sentido



la teoría de R.C. Bone (174) pretende aclarar la incógnita suscitada: la respuesta proinflamatoria intensa en respuesta a la infección, produce una respuesta compensatoria antiinflamatoria, esta sería la principal causa de inmunosupresión (anergia) observada en la sepsis.

A continuación se esquematiza la cascada de eventos que conducen al desarrollo, incremento y establecimiento de la sepsis.



Una vez establecida la sepsis, el shock séptico aparece cuando el paciente presenta problemas en uno o más órganos (DMO). En esta situación, el organismo no recibe suficiente cantidad de oxígeno para funcionar apropiadamente, y es necesaria la administración de fármacos llamados “vasopresores” para aumentar la presión sanguínea. Los enfermos con shock séptico son enfermos muy graves que necesitan ingreso urgente en la unidad de cuidados intensivos (“UCI”) sin embargo, a pesar del tratamiento activo en la UCI, la mortalidad es elevada.

Con el objetivo de entender los mecanismos fisiopatológicos de la sepsis y de esta manera estudiar el desarrollo de nuevas drogas para su tratamiento, diferentes modelos animales están siendo utilizados.

Los modelos en animales de sepsis para su estudio se clasifican en 3 (tres) categorías: a) inoculación de una toxina exógena (por ej, Lipopolisacárido); b) alteración de la estructura de algún órgano como por ejemplo el intestino por punción y ligadura cecal y c) por inoculación o infusión de bacterias vivas o inactivadas.

En la actualidad no hay un medicamento apropiado para el tratamiento de la sepsis. Las líneas de investigación en curso tienen dos objetivos principales: por un lado, evitar una exagerada respuesta inflamatoria y por otro lado, rescatar al sistema inmune del estado de anergia (174).

Durante la evaluación y análisis de datos *in vivo* para determinar la actividad inmunoestimulante del ODN 504 en ratas y monos, observamos una menor dispersión de la respuesta en los grupos experimentales que recibieron el oligonucleótido. Este hecho, sumado a los elevados niveles de anticuerpos anti HBsAg en monos *Cebus apella* (capítulo C) observado solo en los animales que recibieron la vacuna de Hepatitis B (AgB<sup>®</sup>) en ausencia del oligonucleótido, nos condujo a pensar en una actividad inmunomoduladora del ODN 504. En consecuencia se decidió evaluar la acción del mismo en un modelo de sepsis en ratas provocado por la inoculación de bacterias.

Basándonos en la bibliografía decidimos utilizar una de las 5 (cinco) especies que comprenden el género *Escherichia*. En este sentido elegimos *Escherichia coli* como una de las principales especies con relevancia clínica (175).

En primera instancia evaluamos la supervivencia en ratas Sprague-Dawley utilizando 2 (dos) cepas de *E.coli* diferentes: O7K1H- y O45K1H10 las cuales tienen la propiedad de ser enteroinvasivas. La caracterización, cultivo y determinación de la concentración de ambas cepas se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Microbiología Dr. Carlos G. Malbrán a cargo de la Dra. Verónica Riestchel.

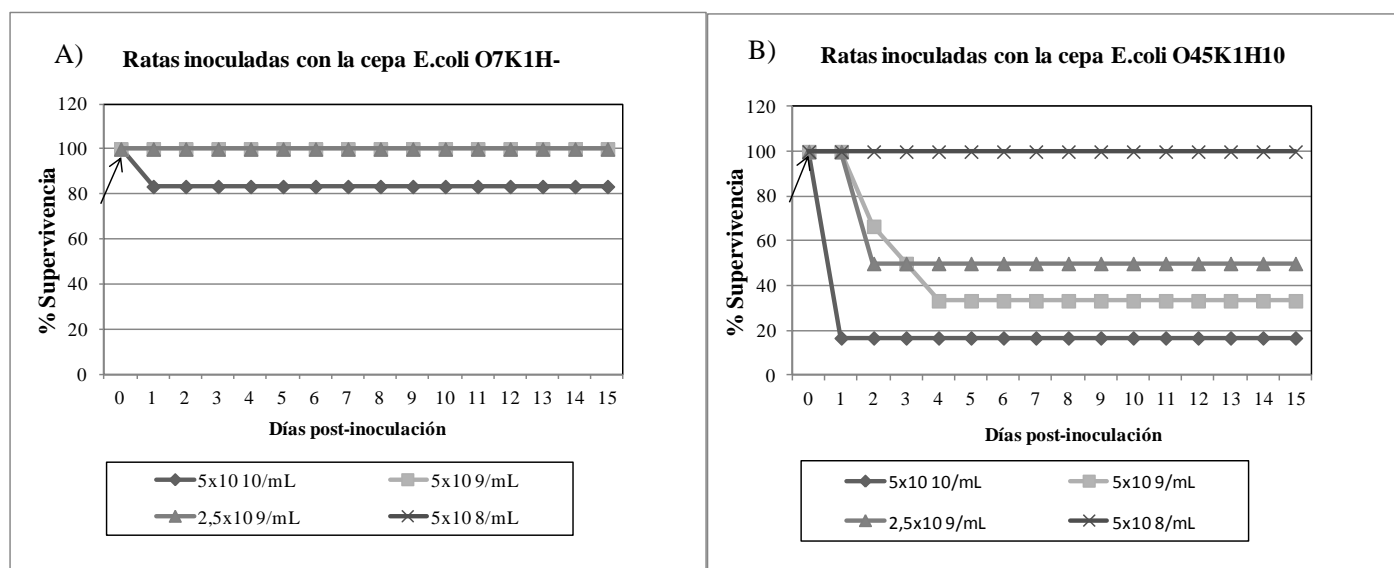
### **Determinación de la concentración óptima de bacterias que provocan Sepsis/ Shock Séptico en ratas Sprague-Dawley.**

En este estudio se evaluó el porcentaje de supervivencia en ratas Sprague-Dawley luego de inocular diferentes concentraciones de las cepas de *E.coli* O7K1H- y O45K1H10 por vía intraperitoneal (i.p).

Se trabajó con 9 (nueve) grupos de 6 (seis) animales cada uno de ratas macho de la cepa Sprague-Dawley. Los animales correspondientes al grupos 1, 2, 3 y 4 recibieron un inóculo de la cepa O7K1H<sup>-</sup>, a una concentración de  $5 \times 10^{10}$ /mL;  $5 \times 10^9$ /mL;  $2.5 \times 10^9$ /mL y  $5 \times 10^8$ /mL respectivamente, mientras que los correspondientes a los grupos 5, 6, 7 y 8 recibieron inóculos de bacterias de la cepa O45K1H10 a las mismas concentraciones. El grupo 9 (nueve) recibió Solución Fisiológica (SF). La inoculación de las bacterias y de la S.F. se realizó por vía intraperitoneal (i.p.). Luego de la inoculación los animales se observaron por un período de 15 (quince) días, dos veces al día.

Como se observa en el gráfico H2, la inoculación de  $5 \times 10^{10}$ /mL bacterias de la cepa O7K1H- provocó aproximadamente un 20% de mortalidad (80% de supervivencia). Sin embargo, el porcentaje de mortalidad fue marcadamente superior cuando se inocularon a los animales con la cepa O45K1H10. La inoculación de esta cepa demostró ser más patogénica que la cepa O7K1H-. Cabe destacar que no se observó la muerte de ningún animal en el grupo inoculado con S.F.

**Gráfico H2: Evaluación de la supervivencia en ratas luego de ser inoculadas con diferentes cepas de *E.coli*.**



Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (6 por grupo) fueron inoculados con diferentes concentraciones de bacterias *Escherichia coli* por vía intraperitoneal (i.p). En el gráfico A) se representa el porcentaje de supervivencia de los animales inoculados con la cepa O7K1H- y en el B) con la cepa O45K1H10. La flecha negra indica el día de inoculación de las bacterias (día 0). El experimento fue repetido 3 (tres) veces y en todos los casos se observaron resultados similares.

Si analizamos el tiempo en el cual se establece la mortalidad en los animales, se puede observar que la misma transcurre dentro de las 48 h. de haber realizado la inoculación de las bacterias, independientemente de la cepa y concentración de bacterias utilizadas. Sólo en la concentración  $5 \times 10^9$ /mL de la cepa O45K1H10 la mortalidad se extendió hasta el día 4 (cuatro).

A pesar que el tiempo en el que ocurrió la muerte de los animales no es representativo de lo que ocurre en sepsis en humanos, se decidió trabajar con la cepa O45K1H10 de *E.coli*.

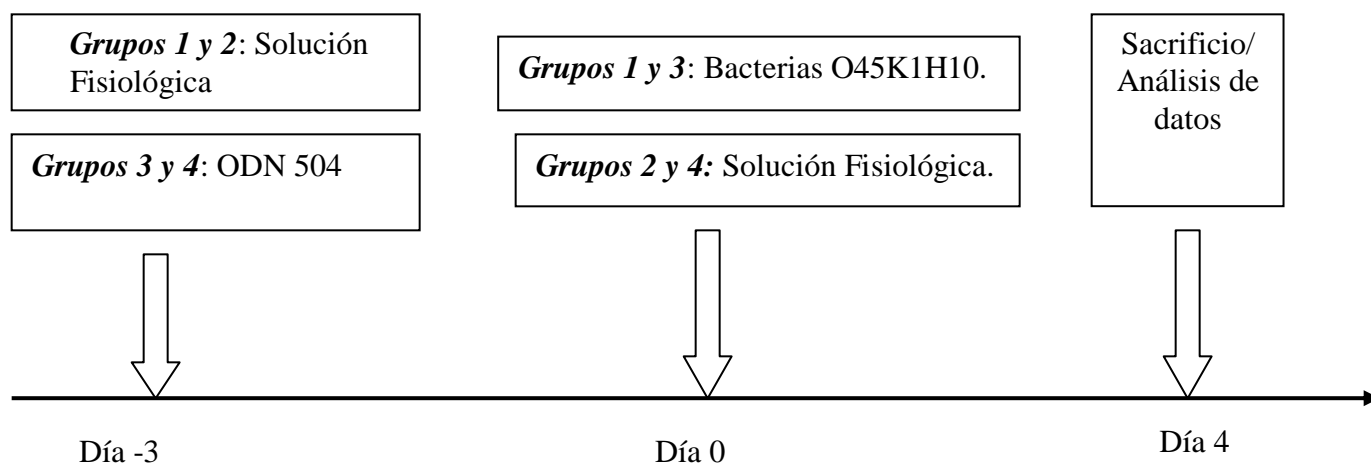
El siguiente paso consistió en evaluar la actividad del ODN 504 en este modelo de shock séptico utilizando la cepa O45K1H10. Para ello, 3 (tres) días previos a la inoculación de las bacterias se trataron los animales con el ODN 504.

### Evaluación de la actividad del ODN 504 en un modelo experimental de sepsis/shock séptico en ratas de la cepa Sprague-Dawley.

En el siguiente estudio se utilizaron 4 grupos de 10 animales cada uno. Tres días previos a la inoculación de las bacterias los animales correspondientes a los *grupos 1 y 2* recibieron 4 dosis cada 3 horas de Solución Fisiológica (S.F.) mientras que los animales de los *grupos 3 y 4* recibieron 4 dosis del ODN 504 por vía subcutánea a los mismos tiempos, cada dosis contenía 6mg del oligonucleótido, de manera que cada animal recibió 24 mg totales. Una vez finalizada las administraciones de S.F u ODN 504 se dejó transcurrir 3 días y se inocularon  $2.5 \times 10^9$  bacterias por animal por vía intra peritoneal. Esta concentración provoca aproximadamente un 50% de mortalidad.

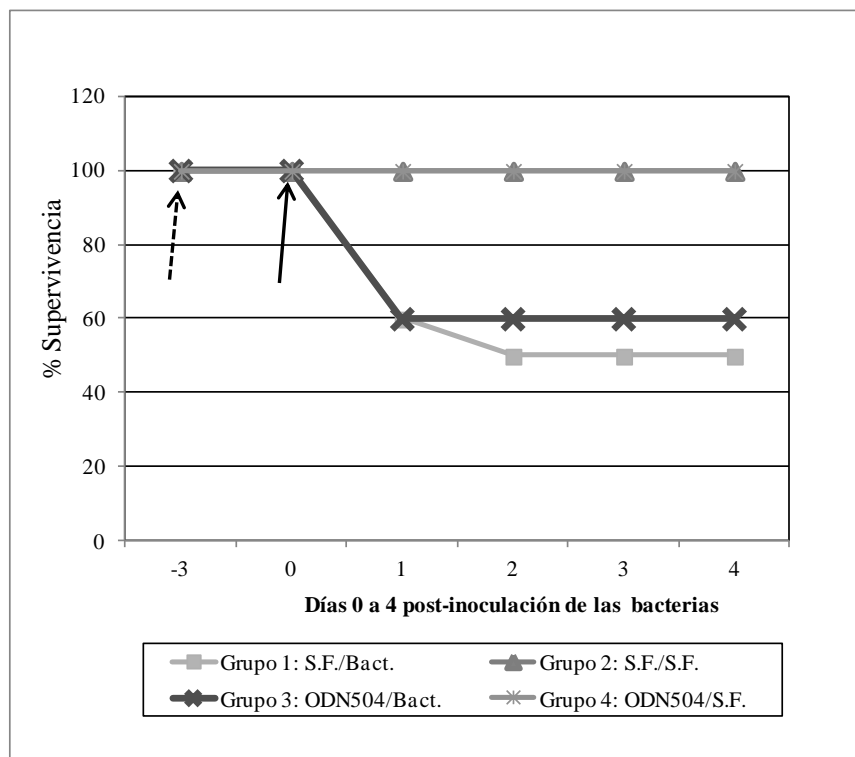
Los animales fueron observados durante un período de 4-5 días, período en el cual se evaluó el porcentaje de supervivencia en todos los grupos.

A continuación se representan las inoculaciones realizadas en los diferentes grupos.



Los resultados demostraron que el tratamiento previo con el ODN 504 no redujo la mortalidad en los animales. El porcentaje de supervivencia en los animales tratados previamente (día -3) con S.F (grupo 1) u ODN 504 (grupo 3) fue similar en ambos casos, gráfico H3.

**Gráfico H3: Evaluación de la supervivencia en ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) recibieron tres días previos (-3) 4 dosis de 6mg cada una en intervalos de 3 horas de ODN 504 (grupos 3 y 4) o S.F (grupos 1 y 2) en los mismos tiempos por vía sub-cutánea (flecha punteada). Al día 0 todos los animales del grupo 2 (SF/SF) y grupo 4 (ODN 504/SF) recibieron S:F. y, los grupos 1 (S.F/Bact) y 3 (ODN 504/Bact) fueron inoculados con  $2,5 \times 10^9$  bacterias de la cepa *Escherichia coli* O45K1H10 por vía intraperitoneal (i.p), la flecha negra indica el día de inoculación de las bacterias (día 0) y de S:F en los grupos 2 y 4. En el gráfico se representa el porcentaje de supervivencia de los animales durante un período de 4 (cuatro) días. El experimento fue repetido 2 (dos) veces y se observaron resultados similares.

Nuevamente observamos que luego de inocular las bacterias la mortalidad se establece rápidamente entre el día 1 y 2. Estos resultados nos limitó el poder utilizar este modelo experimental como representativo de la sepsis en humanos.

La literatura especializada indica que los pacientes que fallecen durante el primer período (24-72h) de la sepsis, se debe al síndrome denominado “Shock Séptico” (176b).

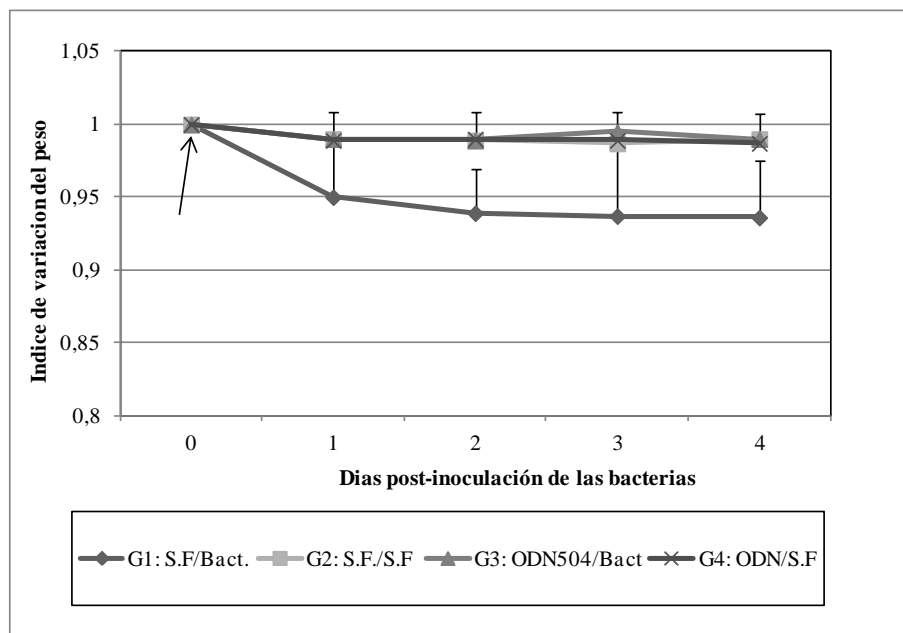
Cuando evaluamos el estado clínico general en los animales que sobrevivieron al día 1, pudimos observar que los animales tratados previamente con el ODN 504 (grupo 3) presentaban un estado clínico general similar a los grupos controles (grupos 2 y 4) los cuales no fueron inoculados con bacterias. En los animales que fueron tratados previamente con S.F y luego recibieron el inóculo de bacterias (grupo 1) se observó un deterioro en su estado clínico como por ejemplo: decaimiento general, alta temperatura, porfiria etc., cuadro H2.

**Cuadro H2. Evolución clínica de los animales luego de la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**

Tratamiento	Inoculación	Animal	Evaluación al día 1	Evaluación al día 2	Evaluación al día 3	Evaluación al día 4
<b>Sol. Fis.</b> (Grupo 2)	<b>Solución Fisiológica</b>	1 al 10	Ok	Ok	Ok	Ok
<b>ODN 504</b> (Grupo 4)		11 al 20	Ok	Ok	Ok	Ok
<b>Sol. Fis.</b> (Grupo 1)	<b>Bacterias O45K1H10</b>	21	+	---	---	---
		22	Ok	P AT	P DG	P DG FR
		23	P; DG+	+	---	---
		24	DG	P DG	Ok	Ok
		25	P DG	P DG	P DG	P DG
		26	Ok	Ok	Ok	Ok
		27	+	---	---	---
		28	P DG	P AT DG	P AT DG	P DG
		29	+	---	---	---
		30	+	---	---	---
<b>ODN 504</b> (Grupo 3)	<b>Bacterias O45K1H10</b>	31	+	---	---	---
		32	+	---	---	---
		33	+	---	---	---
		34	P	Ok	Ok	Ok
		35	+	---	---	---
		36	Ok	Ok	Ok	Ok
		37	P; DG+	DG	Ok	Ok
		38	Ok	Ok	Ok	Ok
		39	P	P	Ok	Ok
		40	Ok	Ok	Ok	Ok
<b>Código de Observaciones:</b> Ok= Sin ninguna manifestación clínica, P: Porfiria; AT: alta temperatura						
DG: decaimiento general; DR: diarrea; FR: aumento en la frecuencia respiratoria; +: muerte del animal						

El peso corporal de los animales fue otro de los indicadores del estado clínico general de los mismos. En los animales que recibieron S.F. se evidenció una disminución del peso corporal con respecto a los que recibieron el oligonucleótido, gráfico H4.

**Gráfico H4. Evolución del peso en ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) recibieron tres días previos (-3) 4 dosis de 6mg cada una en intervalos de 3 horas de ODN 504 o S.F en los mismos tiempos por vía sub-cutánea. Al día 0 todos los animales del grupo 2 (SF/SF) y grupo 4 (ODN 504/SF) recibieron S:F. y, los grupos 1 (S.F/Bact) y 3 (ODN 504/Bact) fueron inoculados con  $2,5 \times 10^9$  bacterias de la cepa *Escherichia coli* O45K1H10 por vía intraperitoneal (i.p), la flecha negra indica el día de inoculación de las bacterias (día 0) y de S.F en los grupos 2 y 4. El índice de variación del peso se determinó de la siguiente manera: peso día X/día 0. El experimento fue repetido 2 (dos) veces y se observaron resultados similares.

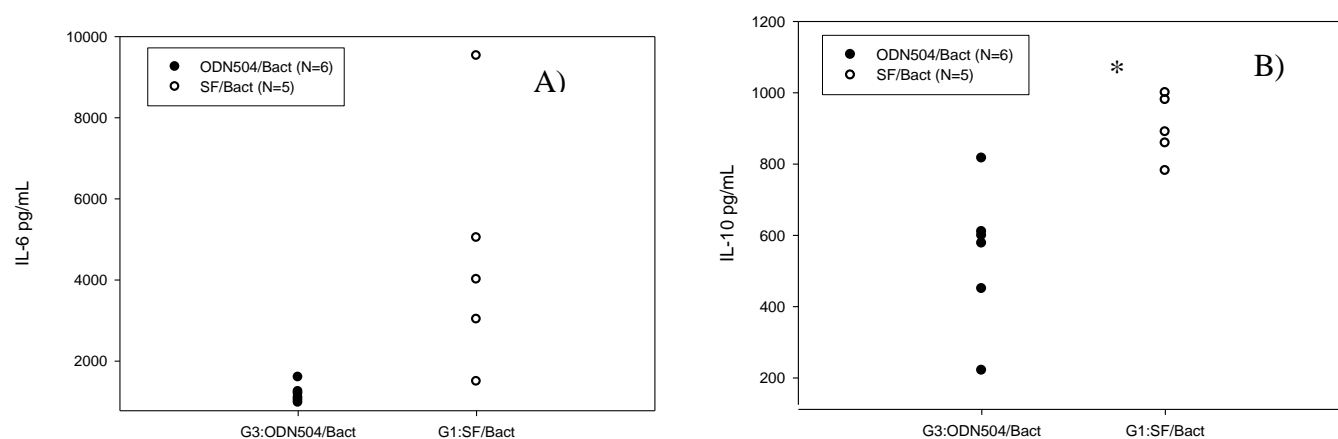
Hasta aquí, podemos observar que los animales que fueron tratados previamente con el ODN 504 presentaron un estado clínico similar a los animales que no fueron inoculados con las bacterias. Estos resultados nos condujeron a pensar que el ODN 504 mejora la condición clínica de los animales. En consecuencia, nos pareció interesante evaluar el nivel de citoquinas en los animales que sobrevivieron.

Como mencionamos anteriormente, durante la sepsis existe una liberación simultánea de citoquinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias, esta falta de equilibrio en la secreción de las mismas es el detonante para conducir a uno de los trastornos hemodinámicos más severos durante la sepsis, el fallo multiorgánico.

Los niveles de IL-6, IL-10 y GM-CSF fueron determinados mediante la técnica ELISA sandwich o de captura en el suero de todos los animales al día 4 (cuatro).

Como se observa en el gráfico H5, los animales que fueron tratados previamente con el ODN 504 presentaron niveles bajos de IL-6 e IL-10 con respecto a los animales que recibieron S.F. En los grupos controles (G2 y G4) no se encontraron valores detectables de estas citoquinas

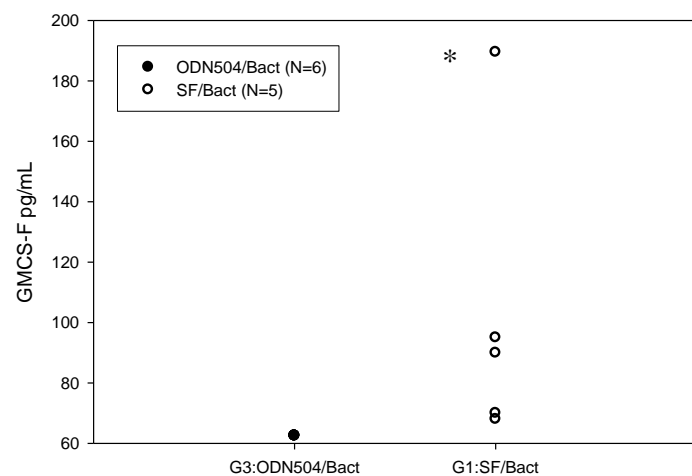
**Gráfico H5. Determinación de las citoquinas IL-6 e IL-10 en el suero de ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Las concentraciones de IL-6, gráfico A) y de IL-10 gráfico B) fueron medidas en el suero de los animales mediante un ELISA de captura utilizando los pares de anticuerpos de Pharmingen DB. La curva estándar fue generada utilizando IL-6/IL-10 recombinante de rata (Pharmingen BD). Las mediciones se realizaron por duplicado en todos los casos. El límite de detección para IL-6 fue de 780 pg/mL y para IL-10 125 pg/mL. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Otra de las citoquinas que se evaluó fue el GM-CSF. La cuantificación de esta citoquina en el G3 ODN/Bact al igual que en los grupos controles (G2 y G4) fue indetectable, a diferencia de lo observado en el grupo SF/Bact, gráfico H6.

**Gráfico H6. Determinación de GM-CSF en el suero de ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Las concentraciones de GM-CSF en el suero de los animales fueron determinadas mediante un ELISA de captura utilizando los pares de anticuerpos de Pharmingen DB. La curva estándar fue generada utilizando GMC-SF recombinante de rata (Pharmingen BD). Las mediciones se realizaron por duplicado en todos los casos. El límite de detección fue de 62.5 pg/mL. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum

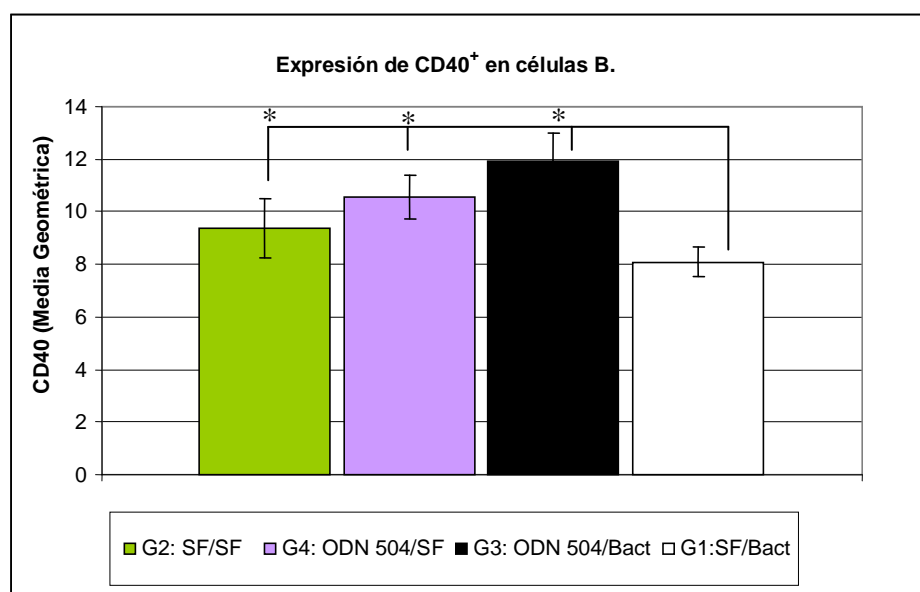


En sepsis, además de los aspectos inflamatorios, la mayoría de las muertes ocurren debido a un aumento en la frecuencia de las infecciones oportunistas que se establecen debido al estado inmunosuprimido presente en los pacientes (anergia).

En función de las observaciones clínicas y fisiológicas observadas en los animales tratados previamente con el ODN 504 que sobrevivieron luego de inocular las bacterias, resultó interesante evaluar si la disminución de los parámetros antes mencionados se debía al establecimiento de un estado de anergia o supresión de la respuesta inmune en estos animales. Por lo tanto, determinamos los niveles de expresión de la molécula CD40 en células mononucleares de sangre periférica CD45R<sup>+</sup> (células B) por citometría de flujo.

Cuando comparamos la expresión de la molécula co-estimuladora CD40 en células B (CD45R<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>) entre los grupos que fueron inoculados con bacterias (grupo 1 y grupo 3), se pudo observar que los animales que fueron tratados con el ODN 504 presentaron un aumento significativo en la expresión de esta molécula (grupo 3) con respecto a los animales que recibieron la S.F. (grupo 1), gráfico H7.

**Gráfico H7. Expresión de CD40 en células B de sangre periférica en ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



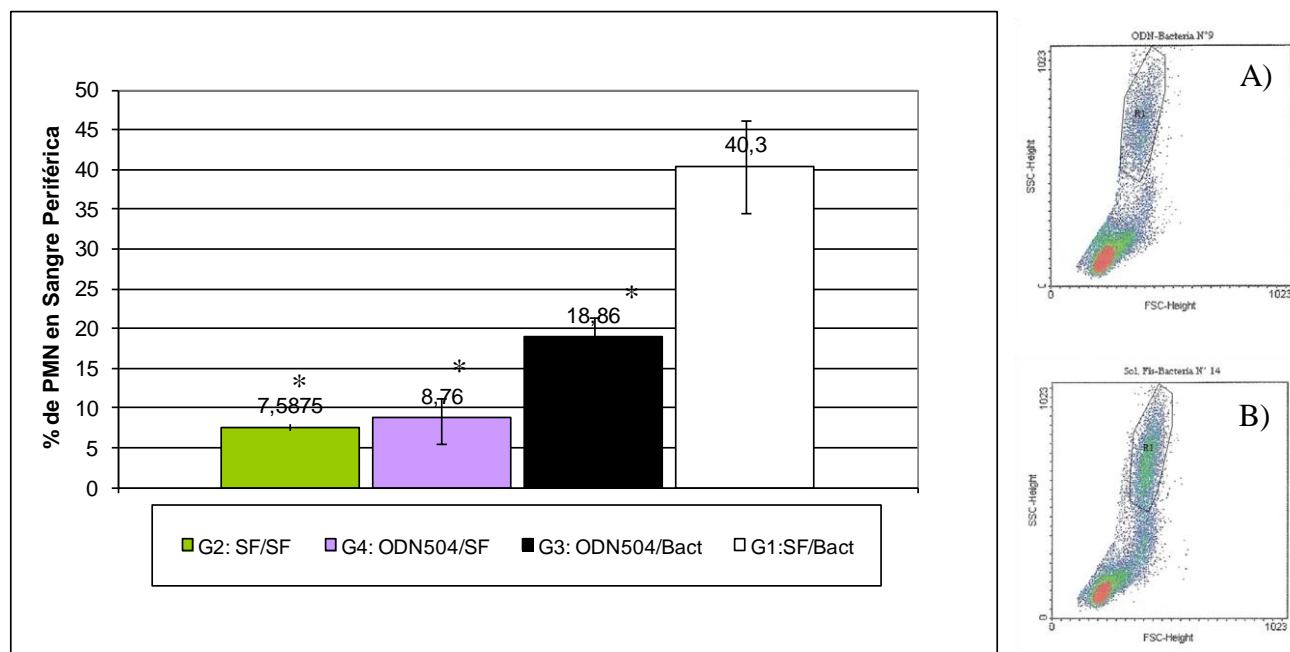
CMSP de cada grupo experimental (G2: SF/SF, G4: ODN 504/SF, G3:ODN 504/Bact, G1: SF/Bact) fueron teñidos con los anticuerpos conjugados a fluorocromos Anti-CD45RPE/Anti-CD40Fitc. Los datos fueron obtenidos utilizando Flow cytometric 50.000 eventos/muestra (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), luego el análisis se realizó utilizando el programa Win MDI 2.8, Interface Flor Cytometry Application (Joseph Trotter Copyright 1993-1998). Las barras representan la media geométrica de la expresión CD40 en células CD45R<sup>+</sup> ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) con respecto al G1(SF/Bact) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Como se puede observar en el grupo 1, luego de 4(cuatro) días de llevar a cabo la inoculación de las bacterias los animales presentan una clara disminución en los niveles de expresión de la molécula CD40 en linfocitos B, demostrando un claro deterioro en la funcionalidad de estas células.

Otra de las poblaciones linfocitarias con relevancia en la sepsis son los polimorfos mononucleares (PMN). Como mencionamos anteriormente, en los primeros estadios de la sepsis se evidencia un aumento de citoquinas inflamatorias, este aumento conduce a la migración de los polimorfonucleares y macrófagos al endotelio. De esta manera, los PMN una vez en el endotelio liberan enzimas proteolíticas y radicales libres.

Teniendo en cuenta el rol de los PMN en la sepsis, evaluamos el porcentaje de esta población celular en los diferentes grupos de animales, gráfico H8.

**Gráfico H8. Evaluación del porcentaje de PMN en ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli***



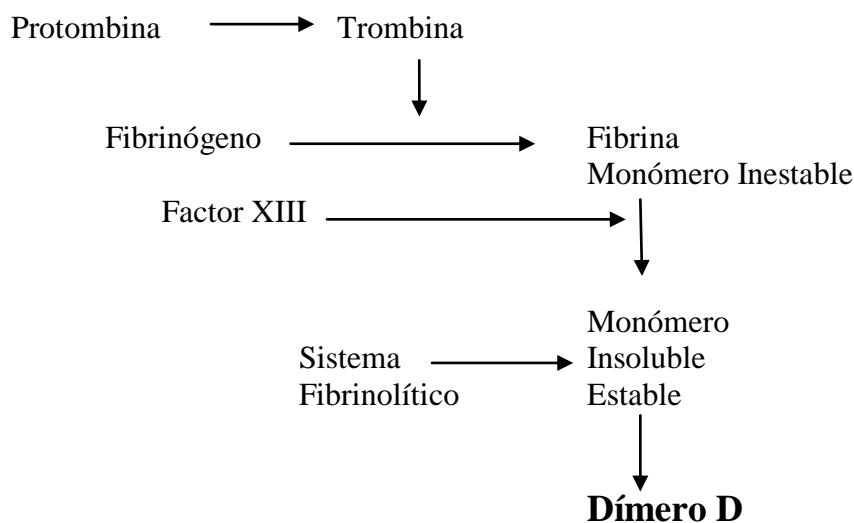
El % de PMN en sangre periférica de cada uno de los animales fue determinado utilizando Flow cytometric (50.000 eventos/muestra Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA). La región correspondiente a los PMN (R1) se seleccionó según FSC/SSC. EL análisis se realizó utilizando el programa Win MDI 2.8, Interface Flor Cytometry Application (Joseph Trotter Copyright 1993-1998). En el recuadro superior se puede observar la Region R1 seleccionada para determinar el % de PMN en: A) animales que recibieron el ODN 504 y B) animales que recibieron S.F.El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Como se observa en el gráfico H8, los animales inoculados con las bacterias que previamente fueron tratados con S.F. (grupo 1) presentaron un mayor porcentaje de PMN con respecto a los tratados con ODN 504 (grupo 3).

Los resultados obtenidos hasta aquí, demostraron que los animales que no recibieron tratamiento previo a la inoculación de las bacterias presentaron un aumento de las citoquinas inflamatorias/anti-inflamatorias, mayor porcentaje de PMN en sangre periférica y una disminución de las células B activadas.

Otra de las alteraciones que se observa durante la sepsis está relacionado con el equilibrio procoagulante-anticoagulante (175). Durante la sepsis, cuando el endotelio vascular es dañado (por acción de las citoquinas, PMN etc) se produce una vasoconstricción local favoreciendo los mecanismos de la coagulación. En paralelo, y con el objetivo de controlar el trombo o coágulo de fibrina se activa el sistema fibrinolítico para evitar el desarrollo de una trombosis difusa. Durante ésta activación se generan diferentes productos de degradación entre los cuales encontramos el dímero D, el cual posee diferenciación antigénica y por lo tanto puede ser dosado.

### Origen molecular del dímero D.

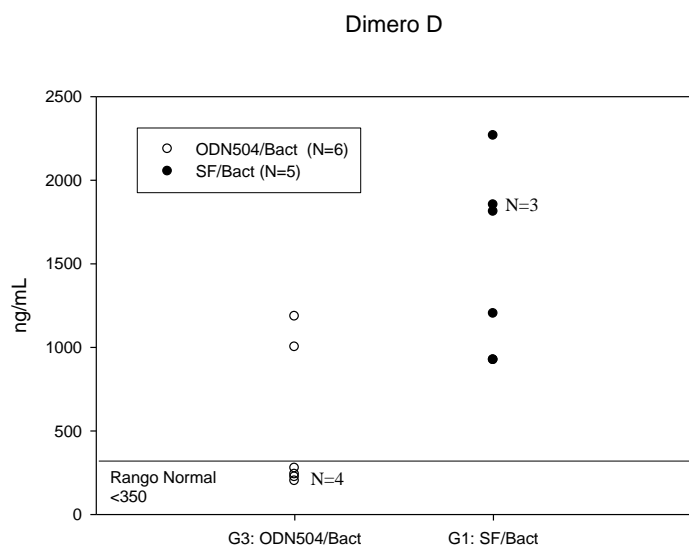


Los niveles circulantes elevados en plasma de dímero D poseen valor diagnóstico como indicador de la formación reciente de un coágulo sanguíneo y confirmación de una trombosis venosa profunda (TVP) o de una embolia.

Con el objetivo de evaluar la actividad que pudiese tener el ODN 504 sobre este mecanismo determinamos la concentración del dímero D en los diferentes grupos experimentales. Previamente, se determinó el rango de concentración de este péptido en ratas Sprague-Dawley normales.

Como se demuestra en el gráfico H9, los animales que recibieron S.F. presentaron valores elevados de dímero D con respecto a los tratados con el ODN 504. Los grupos controles (G2 y G4) presentaron valores <350ng/mL (rango normal).

**Gráfico H9. Determinación del dímero D en ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 previo a la inoculación de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Las determinaciones de dímero D se realizaron en el plasma de los animales inoculados con bacterias y tratados con ODN 504 (G3) o S.F. (G1), utilizando reactivos de marca Weiner® Cobas 511 de Roche, en el autoanalizador Selectra®, rango normal de dímero D <350 ng/mL en ratas Sprague-Dawley.

En el grupo tratado con el ODN 504, cuatro de seis animales presentaron valores dentro del rango normal, a diferencia de los animales que recibieron S.F donde todos los animales (seis) presentaron valores comprendidos entre 900-2200 ng/mL.

Tomando en conjunto todos los resultados, podemos concluir que si bien el ODN 504 no reduce la mortalidad en este modelo de shock séptico, aquellos animales que sobreviven al shock séptico y previamente fueron tratados con el ODN 504 presentaron un mejor estado clínico y fisiológico que se refleja en el peso corporal, los niveles de citoquinas (IL-6; IL10 y GMC-SF), porcentaje de células B activadas, polimorfonucleares (PMN) y dímero D.

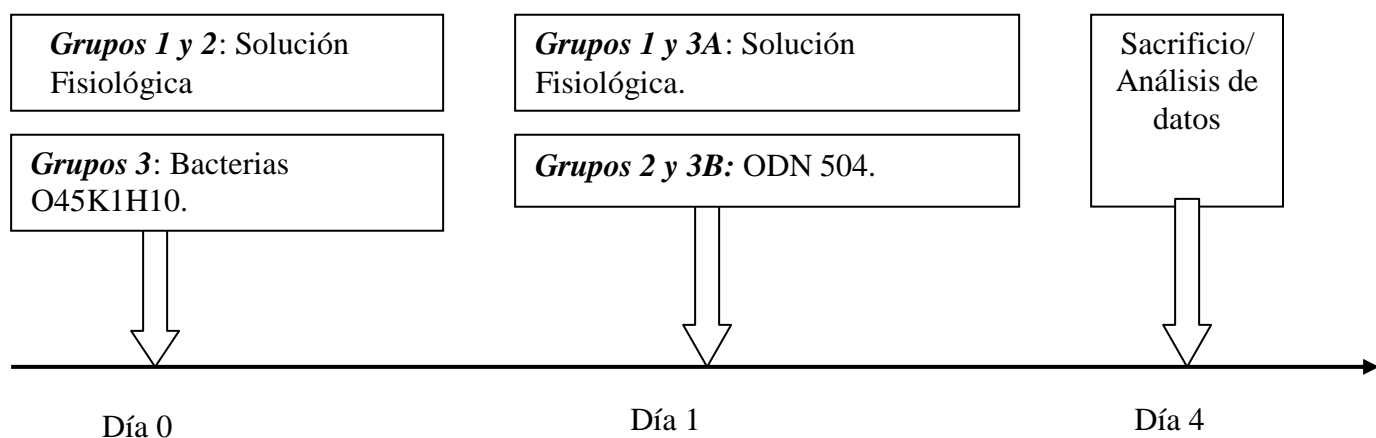
El siguiente objetivo planteado por nosotros fue evaluar la actividad del ODN 504 luego de inducir sepsis/shock séptico en ratas Sprague-Dawley por la inoculación de bacterias E.coli O45K1H10 por vía intra-peritoneal.

### **Evaluación de la actividad del ODN 504 luego de inocular bacterias de la cepa O45K1H10 Escherichia coli en ratas Sprague-Dawley.**

Teniendo en cuenta que el ODN 504 mejora la condición clínica y fisiológica de los animales cuando se lo administra en forma preventiva, tres días previos a la inoculación de las bacterias, fue interesante evaluar la actividad del ODN 504 con una administración terapéutica luego de inocular las bacterias.

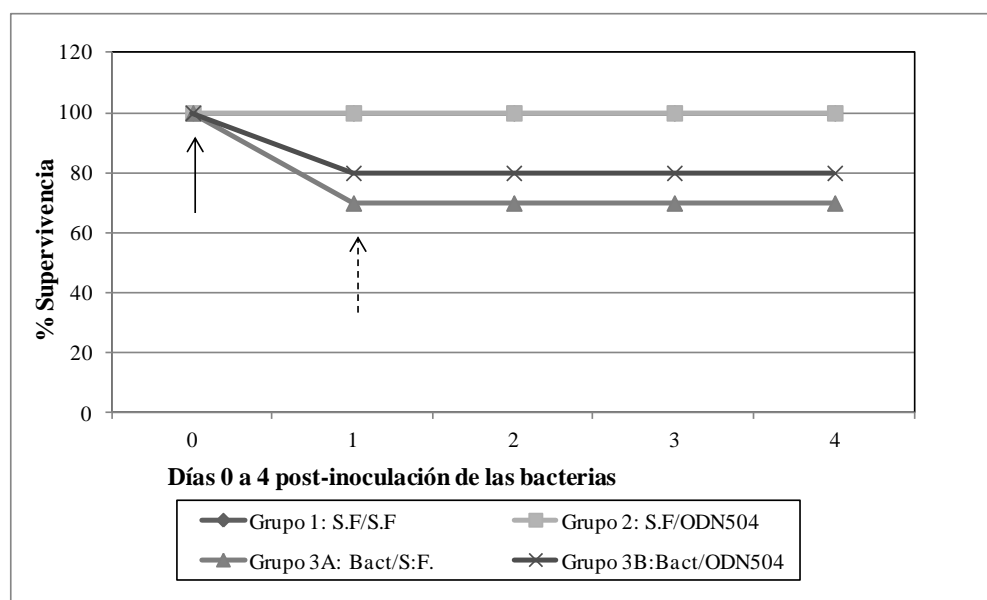
En el siguiente estudio se utilizaron 40 animales divididos en 3 grupos. Los grupos **1 y 2** (controles) estuvieron conformados por 10 animales cada uno y el **grupo 3** (experimental) por 20 animales. A los animales del grupos 1 y 2 se les inoculó al día 0 (cero) una única dosis de Solución Fisiológica y al grupo 3 se les inoculó  $1 \times 10^9$  bacterias de la cepa O45K1H10 *Escherichia coli* a cada animal. En ambos casos las inoculaciones fueron por vía intra-peritoneal. A diferencia del protocolo anterior se inoculó menor cantidad de bacterias,  $1 \times 10^9$  en vez de  $2.5 \times 10^9$ , con el objetivo de obtener un mayor porcentaje de supervivencia de los animales. Un día después (día 1) los animales del **grupo 1** recibieron en total 4 dosis de S.F. administradas cada una en intervalos de 3 horas, mientras que los animales del **grupo 2** recibieron un esquema similar de 4 dosis del ODN 504. Cada dosis contenía 6 mg de oligonucleótido, de manera que cada animal recibió 24 mg totales, en todos los casos las inoculaciones se realizaron por vía sub-cutánea. A este tiempo, los animales del grupo 3 ya presentaban signos clínicos evidentes en respuesta a la inoculación de las bacterias como por ejemplo, diarrea, porfiria, decaimiento general o alta temperatura. En función de esta observación cada animal fue examinado exhaustivamente para formar dos sub-grupos de animales similares en cuanto a su estado clínico. Luego se conformaron los **grupos 3A y 3B** cada uno con 10 animales, el **grupo 3A** recibió 4 dosis en total, una dosis cada 3 horas de Solución Fisiológica (S.F.) mientras que los animales del **grupo 3B** recibieron 4 dosis del ODN 504 de 6 mg c/u por vía subcutánea en similares condiciones que el grupo 3A.

A continuación se representan las inoculaciones realizadas en los diferentes grupos.



No se observaron diferencias en la supervivencia durante todo el período de estudio entre los grupos tratados con el oligonucleótido (grupo 3B) o con SF (grupo 3 A). En este punto, hay que recordar que la mortalidad en estos animales independientemente de la concentración de bacterias, se manifiesta entre las 24-48h luego de inocular las bacterias, gráfico H10.

**Gráfico H10. Evaluación de la supervivencia en ratas Sprague-Dawley tratadas con el ODN 504 luego de 24 h. de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (10 por grupo) fueron inoculados al día 0 (cero) con  $1 \times 10^9$  de bacterias de la cepa *Escherichia coli* O45K1H10 (grupos 3A y 3B) o S.F. (grupos 1 y 2) por vía intraperitoneal (i.p), estas inoculaciones se indican con la flecha negra sólida. Al día 1 el grupo 2 y 3B recibió 4 dosis de 6mg cada una en intervalos de 3 horas de ODN 504, los grupos 1 y 3A recibieron SF con el mismo esquema, indicadas con la flecha negra punteada. En el gráfico se representa el porcentaje de supervivencia de los animales durante un período de 4 (cuatro) días. El experimento fue repetido 2 (dos) veces y se observaron resultados similares.

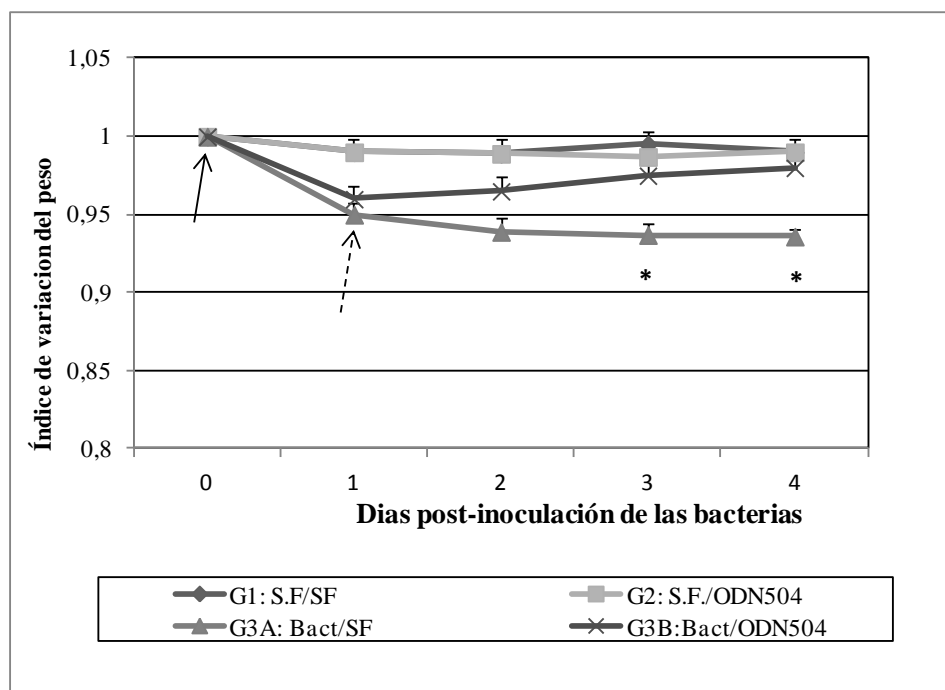
Cuando evaluamos el estado clínico general en los animales que sobrevivieron al día 1, pudimos observar que independientemente del tratamiento empleado desde el día 1 hasta el día 4, todos los animales presentaban una mejoría de su estado clínico entre el día 3 y 4. En este aspecto tampoco se observaron diferencias entre los animales tratados con el ODN 504 o los que recibieron S.F. (cuadro H3).

**Cuadro H3: Evolución clínica de los animales tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**

Inoculación	Tratamiento día 1	Animal	Evaluación al día 1	Evaluación al día 2	Evaluación al día 3	Evaluación al día 4
<b>Solución Fisiológica</b>	S. F (grupo 1)	1 al 10	Ok	Ok	Ok	Ok
	ODN 504 (grupo 2)	11 al 20	Ok	Ok	Ok	Ok
<b>Bacterias O45K1H10 1x10<sup>9</sup>/ animal</b>	<b>S.F (grupo 3A)</b>	21	P DG	DG	Ok	Ok
		22	DG+	P	Ok	Ok
		23	P AT	P	Ok	Ok
		24	+	---	---	---
		25	DG	P DG	DG	Ok
		26	+	---	---	---
		27	DG+	DG+ P	DG	Ok
		28	DR DG	P	P	Ok
		29	DR P	DR AT P	DR P	DG P
		30	+	---	---	---
	<b>ODN 504 (grupo 3B)</b>	31	+	---	---	---
		32	DG AT	DG	Ok	Ok
		33	DG	P	Ok	Ok
		34	DR DG	DG	P	Ok
		35	P DG	P	Ok	Ok
		36	DR DG AT	DG AT	DG	P
		37	DG P	DG	Ok	Ok
		38	+	---	---	---
		39	DG	P DG	DG	Ok
		40	DR DG	DG	Ok	Ok
<b>Código de Observaciones:</b> Ok= Sin ninguna manifestación clínica, P: Porfiria; AT: alta temperatura DG: decaimiento general; DR: diarrea; FR: aumento en la frecuencia respiratoria; +: muerte del animal						

Sin embargo, cuando se evaluó la evolución del peso corporal durante el estudio se pudo observar una lenta y progresiva recuperación del peso en los animales que recibieron el ODN 504 (grupo 3B), a diferencia de lo observado en los animales que recibieron S.F. (grupo 3A) como tratamiento (gráfico H11).

**Gráfico H11. Evolución del peso en ratas Sprague-Dawley tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



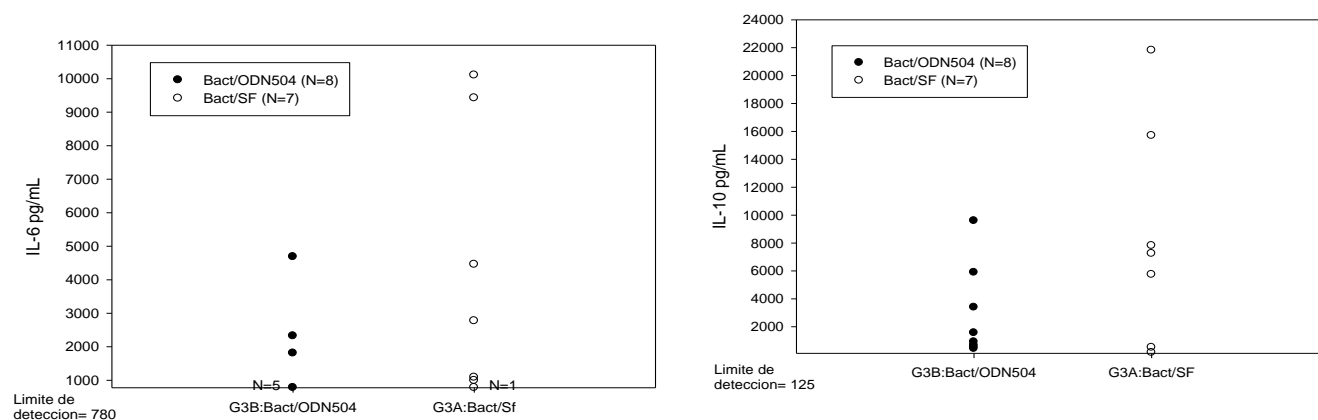
Ratas macho de la cepa Sprague-Dawley inoculados con  $1 \times 10^9$  bacterias de la cepa *Escherichia coli* O45K1H10 (G3A y G3B) o S.F (G1 y G2) por vía intraperitoneal (i.p), indicado con una flecha negra sólida. Al día 1 el grupo 2 y 3B recibió 4 dosis de 6mg cada una en intervalos de 3 horas de ODN 504 y, los grupos 1 y 3A recibieron SF, indicado con una flecha negra punteada. El índice de variación del peso se determinó de la siguiente manera: peso día X/día 0. Todos los animales fueron pesados desde el día 0 (cero) hasta el día 4 (cuatro). En el gráfico se representa el promedio del índice de variación de cada grupo experimental y su correspondiente desvío Standard. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test entre los grupos G3A y G3B.

En cuanto a la determinación de citoquinas en suero (IL-6 e IL-10), se evidenció un leve aumento en estas citoquinas en los animales que recibieron S.F. (G 3A) cuando se los comparó con los animales que fueron tratados con el ODN 504 (G 3B) gráfico H12.

Cabe destacar que ningún animal de los grupos controles (grupos 1 y 2) presentaron valores detectables de estas citoquinas.



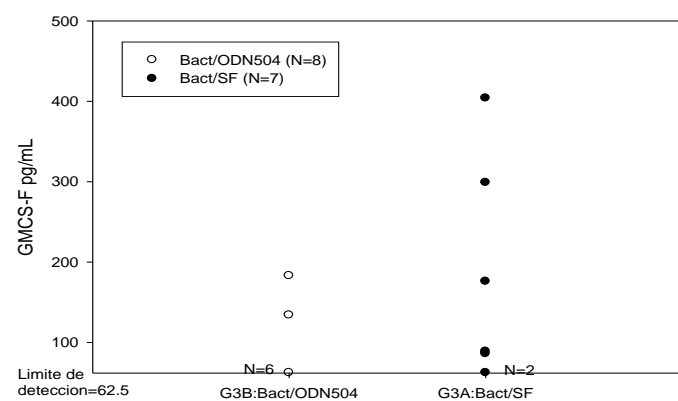
**Gráfico H12. Determinación de las citoquinas IL-6 e IL-10 en el suero de ratas Sprague-Dawley tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Las concentraciones de IL-6, gráfico A) y de IL-10 gráfico B) fueron determinadas mediante un ELISA de captura utilizando los pares de anticuerpos de Pharmingen DB. La curva estándar fue generada utilizando IL-6/IL-10 recombinante de rata (Pharmingen BD). Las mediciones se realizaron por duplicado en todos los casos. El límite de detección para IL-6 = 780 pg/mL y para IL-10= 125 pg/mL.

Otra de las citoquinas que se determinó su concentración fue el GM-CSF. En el grupo tratado con el ODN 504 solo dos animales de ocho (2/8) presentaron valores detectables de esta citoquina a diferencia del grupo que recibió S.F. En este grupo, cinco de siete animales (5/7) presentaron valores detectables y elevados de GM-CSF. Los grupos controles (grupos 1 y 2) no presentaron valores detectables de estas citoquinas, gráfico H13.

**Gráfico H13. Determinación de GM-CSF en el suero de ratas Sprague-Dawley tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



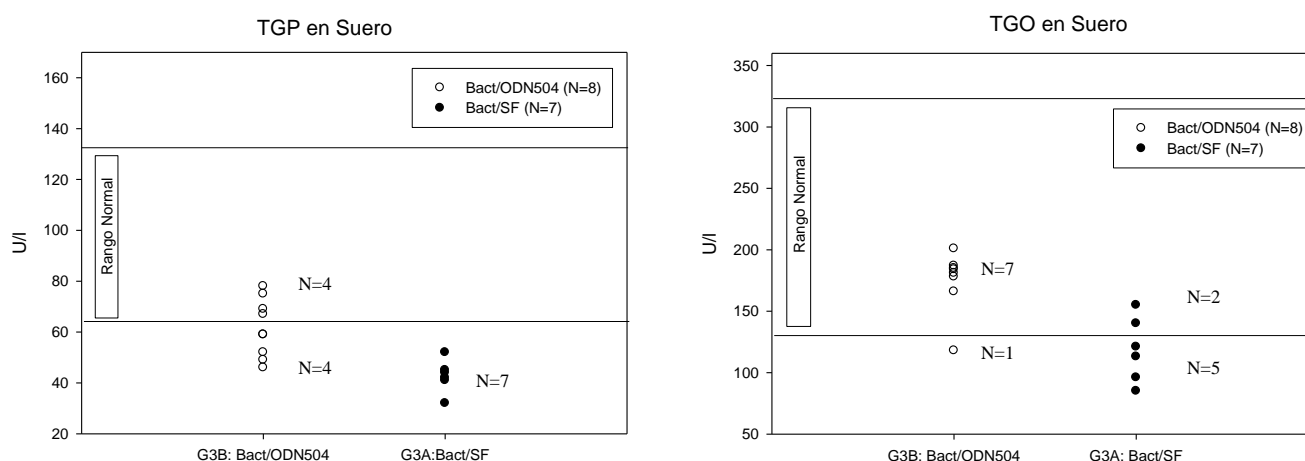
Las concentraciones de GMC-SF fueron determinadas mediante un ELISA de captura utilizando los pares de anticuerpos de Pharmingen DB. La curva estándar fue generada utilizando GMC-SF recombinante de rata (Pharmingen BD). Las mediciones se realizaron por duplicado en todos los casos. El límite de detección 62,5 pg/mL.

Hechos importantes de describir fueron las alteraciones macroscópicas encontradas en el grupo tratado con S.F. (G 3A) durante la necropsia (día 4 post-inoculación de las bacterias). Entre estas alteraciones caben destacar por ejemplo: el color blanco del ganglio mesentérico y su tamaño significativamente agrandado, el hígado presentaba un color pálido (sin brillo) y se encontraba pigmentado con puntos rojos en su totalidad, y los riñones también presentaban un color pálido con la presencia de puntos blancos. Estas observaciones nos condujeron a determinar los niveles de la Transaminasa Glutámico Pirúvica (TGP) y de la Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO) debido a que la determinación de estas enzimas son importantes en la clínica médica. Una alteración o desequilibrio en los niveles de estas enzimas puede indicar el establecimiento de un proceso necrótico en órganos con alta funcionalidad como puede ser el hígado o el miocardio.

Con el objetivo de determinar el rango de concentración de ambas enzimas en ratas normales, se procesaron 40 animales a los cuales se les extrajo una muestra de suero y se cuantificó la concentración de ambas enzimas.

En el gráfico H14, se representan los niveles TGO y TGP en el suero de los animales tratados con S.F (G3A) y ODN 504 (G3B) luego de inocular las bacterias. Los valores de TGP/TGO de los grupos controles (grupos 1 y 2) presentaron valores dentro del rango normal.

**Gráfico H14. Determinación de TGP/TGO en el suero de ratas Sprague-Dawley tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**



Las determinaciones de TGP/TGO se realizaron en el plasma de los animales utilizando reactivos de marca Weiner® Cobas 511 de Roche en el autoanalizador Selectra®. El rango normal para la TGP es de 62 a 138 U/l y para la TGO de 132 a 349 U/l.

Como se puede observar en el gráfico H14, en el grupo tratado con el ODN 504 cuatro de ocho animales (50%) presentaron valores de TGP que se encuentran en el rango normal determinado por nosotros. Sin embargo, todos los animales (100%) que recibieron S.F. presentaron valores que se encuentran por debajo del límite inferior (<62 U/l). Similares resultados encontramos en el análisis de la TGO, donde la mayoría de los animales de este grupo (5 de 7) presentaron valores por debajo del valor mínimo del rango de normalidad, a diferencia del grupo tratado con ODN 504.

Como mencionamos anteriormente, la sepsis es uno de los principales factores responsables del fallo multiorgánico (FMO). En la actualidad el término FMO se sustituye por disfunción multiorgánica (DMO), debido a que este término abarca desde la alteración de una enzima hasta el fallo incipiente de algún órgano, acompañado o no de signos clínicos. Considerando las alteraciones macroscópicas observadas en nuestro modelo experimental, se analizó histológicamente el hígado de cada uno de los animales.

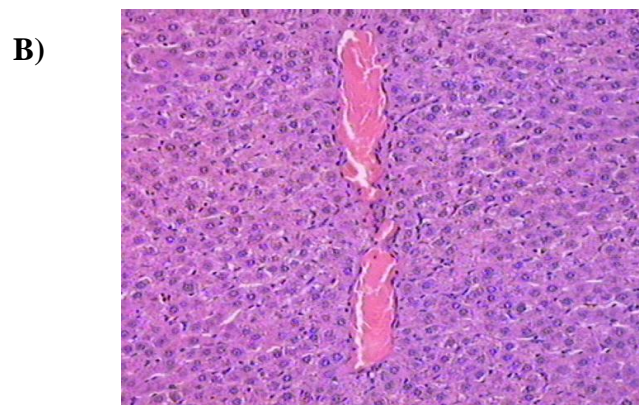
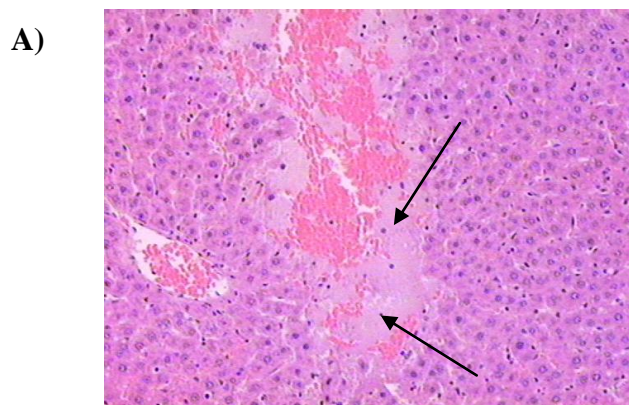
El día del sacrificio (día 4) se extrajo el hígado de cada animal y se procedió a su fijación en una solución de paraformaldeído (4%), luego se procesaron con parafina y se realizaron cortes de 5µm los cuales fueron teñidos con hematoxilina/eosina y el colorante tetracómico (método de Masson). Esta técnica se utilizó con el objeto de poner de manifiesto y magnificar el detalle en las áreas de necrosis. Las muestras fueron evaluadas en forma ciega estableciéndose un score ad hoc. por el médico patólogo Dr. Nestor Lago.

Como se puede observar en el cuadro H4, los animales que fueron inoculados con las bacterias y luego recibieron S.F. presentaron un mayor grado de necrosis en el hígado. En este grupo, cinco de siete animales (5/7) presentaron necrosis moderada (más de 2 focos concluyentes), mientras que en el grupo tratado con el ODN 504 solo un animal de ocho (1/8) presentó el mismo grado de lesión.

**Cuadro H4. Histopatología del hígado en ratas Sprague-Dawley tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 *E.coli*.**

Inoculación	Tratamiento	Animal	Necrosis en el Hígado
Sol. Fis.	Sol. Fis.	1 al 10	0
	ODN- 504	11 al 20	0
Bacterias O45K1H10	Sol. Fis.	21	3
		22	2
		23	3
		25	2
		27	2
		28	2
		29	2
	ODN 504.	32	1
		33	0
		34	0
		35	1
		36	2
		37	1
		39	1
40	1		
Referencias de Necrosis	0=Sin Necrosis		
	1=Necrosis leve: menos de 2 Focos confluyentes		
	2=Necrosis Moderada: 2 Focos confluyentes		
	3=Áreas de Necrosis: Más de 3 Focos confluyentes.		

A continuación se muestra una fotografía ilustrando la necrosis focal, grado 2, y su respectiva comparación con la histo-arquitectura de un hígado normal.



A) Alteraciones histopatológicas del hígado grado 2 (2 focos confluyentes, flechas negras). B) Arquitectura de un hígado normal, vena portal con pared vascular sin alteraciones, grado 0. Aumento 4x.

Este tipo de alteraciones muchas veces se encuentran representadas en el hígado de pacientes infectados por alguna hepatitis viral ya sea A, B o C. Generalmente acompañando a esta necrosis se observa un infiltrado inflamatorio en los espacios porta y en la zona del lobulillo, a este tipo de infiltración se la denomina Inflamación Lobular. Analizando el grado de inflamación lobular en todos los animales se pudo observar un mayor grado de lesión en el grupo que recibió S.F. comparado con los animales que recibieron el ODN 504 como tratamiento, cuadro H5.

**Cuadro H5. Inflamación Lobular en el hígado de ratas Sprague-Dawley tratados con el ODN 504 o S.F luego de la inoculación de bacterias de la cepa O45K1H10 E.coli.animales.**

Inoculación	Tratamiento	Animal	Inflamación Lobular
Sol. Fis.	Sol. Fis.	1 al 10	0
	ODN-504	11 al 20	0
Bacterias O45K1H10	Sol. Fis.	21	3
		22	3
		23	3
		25	2
		27	3
		28	3
		29	2
	ODN 504.	32	1
		33	1
		34	1
		35	1
		36	2
		37	1
		39	2
40	1		
Referencias	0=Sin Alteraciones		
	1=Mínimo Cuestionable		
	2=Leve		
	3=Moderado /4=Intenso		

En conclusión, cuando el ODN 504 se administra 24h. luego de inocular las bacterias, si bien en los animales no se observaron diferencias desde el punto de vista clínico, salvo recuperación en el peso,

cuando se evaluaron parámetros fisiológicos e histológicos, se evidenció una clara tendencia en la disminución de las lesiones en los animales tratados con el oligonucleótido.

El ODN 504 no reduce la mortalidad en este modelo experimental, sin embargo, los animales que sobreviven presentan un mejor estado clínico, fisiológico, inmunológico e histológico que se refleja en parámetros como: el peso corporal, los niveles de citoquinas (IL-6; IL10 y GMC-SF), porcentaje de células B activadas, polimorfonucleares (PMN), dímero D e histopatología del hígado.

En función de estos resultados alentadores, el siguiente objetivo propuesto por nosotros fue evaluar la efectividad del ODN 504 *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humana de pacientes sépticos.

### **Evaluación de la actividad del ODN 504 *in vitro* en pacientes politraumatizados.**

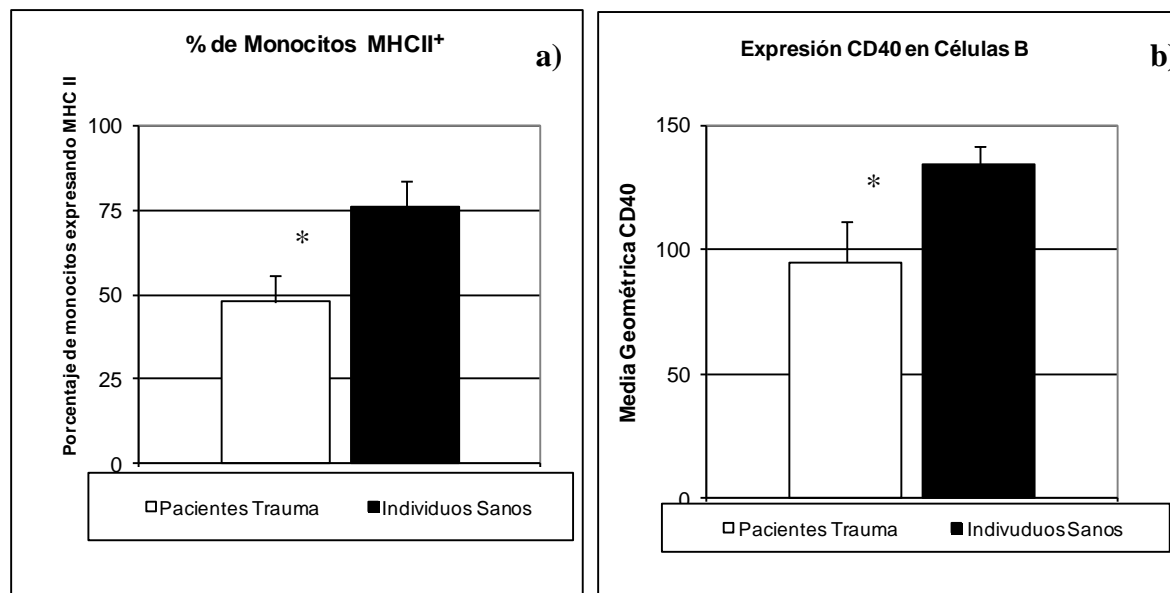
Teniendo en cuenta la actividad inmunomoduladora del ODN 504 en animales sépticos, nos pareció interesante evaluar la actividad del ODN 504 en sangre periférica de pacientes politraumatizados. Por definición, un paciente politraumatizado es un paciente grave o con alto grado de riesgo de pérdida de la vida por presentar dos o más lesiones que comprometen su vida (175).

Diferentes estudios clínicos y experimentales demostraron que luego de desencadenarse la respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria sistémica (característica de la sepsis), se evidencia una disminución en la expresión del MHCII (HLA-DR) en monocitos (177). Por lo tanto, en primera instancia evaluamos el estado inmunológico de los pacientes con trauma severo, para ello se determinaron los niveles de IL-6; la expresión del MHCII sobre monocitos y de CD40 en células B previo a la incubación con el ODN 504, es decir ni bien recibíamos la sangre del paciente politraumatizado. Los resultados se compararon con sangre periférica proveniente de voluntarios sanos.

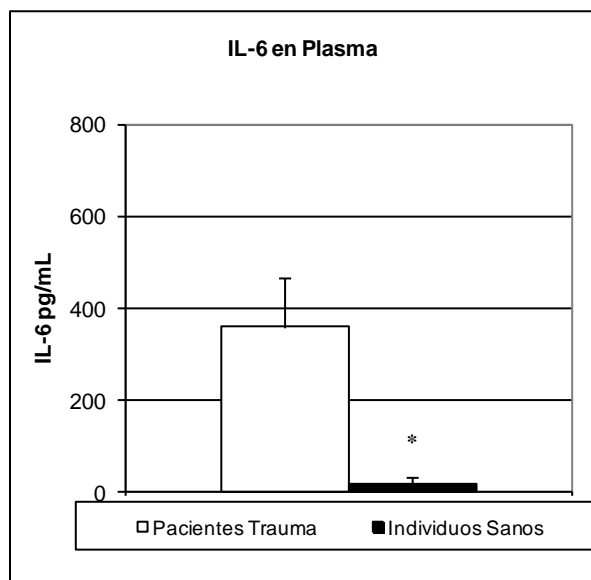
Este estudio fue realizado respetando los lineamientos establecidos por el comité de educación e investigación del Hospital Pedro Fiorito y el Hospital Profesor Alejandro Posadas (Buenos Aires).

Como se observa en el gráfico H15, los pacientes politraumatizados presentan una disminución en el porcentaje de monocitos expresando MHCII ( $49.28 \pm 12.28$  vs.  $80.34 \pm 12.16$ ), y de la intensidad en la expresión de la media geométrica (Gm) de CD40 en células B CD19<sup>+</sup> (Gm  $95 \pm 26$  vs.  $134 \pm 14$ ). Los niveles de IL-6 en plasma se encontraron aumentados en los pacientes politraumatizados. Todos estos marcadores indican una alteración del sistema inmunológico conforme a lo reportado en la bibliografía (177, 178).

Gráfico H15. Comparación del estado inmunológico en pacientes politraumatizados e individuos sanos.



CMSP humanas fueron obtenidas y teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos: a) RPE conjugado a CD14 and FITC conjugado a HLA Class II DP, DQ DR. Los datos se expresan como porcentaje de monocitos (CD14<sup>+</sup>)-MCHII<sup>+</sup>; b) R. Phycoerythrin (RPE) Anti CD19; Fluorescein Isothiocyanate Isomer 1 (FITC) CD40. Los datos corresponden a la media geométrica CD40 en poblaciones CD19<sup>+</sup>. Los anticuerpos fueron obtenidos de Serotec (Raleigh, NC, USA). El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,001$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

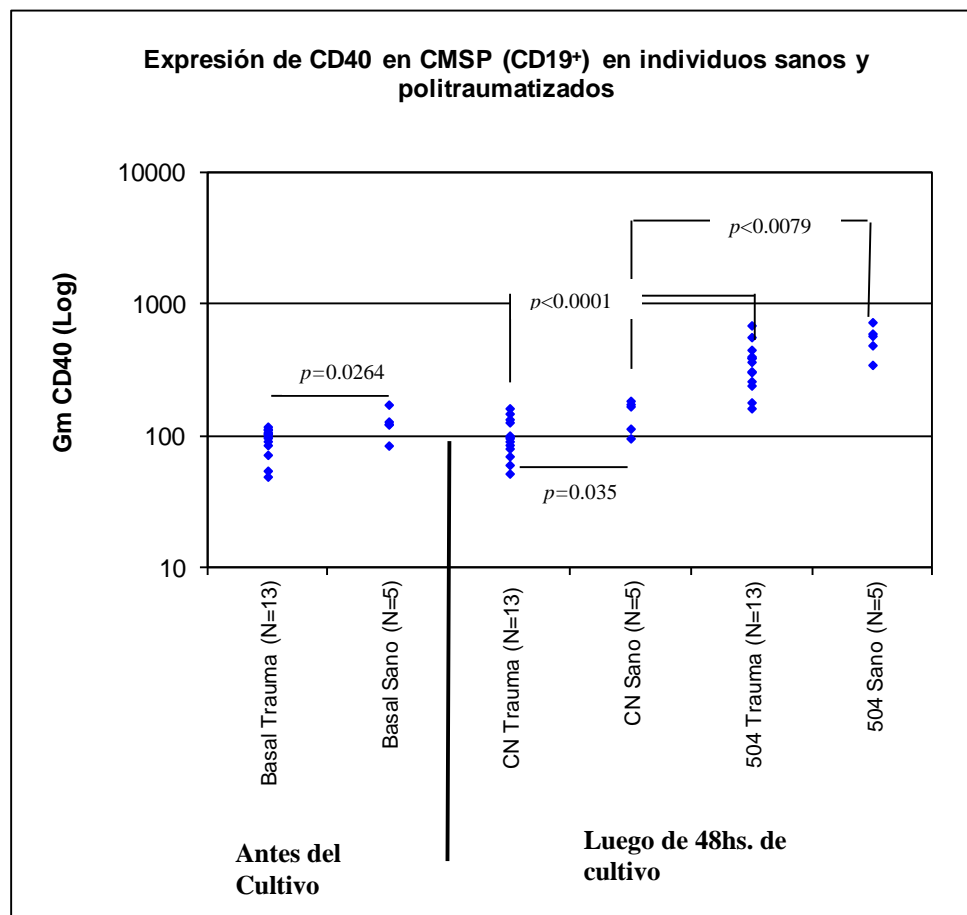


Las concentraciones de IL-6 en plasma fueron determinadas mediante la técnica ELISA de captura utilizando los pares de anticuerpos de Pharmingen DB. La curva estándar fue generada utilizando IL-6h recombinante (Pharmingen BD). Las mediciones se realizaron por duplicado en todos los casos. El límite de detección es igual a 15 pg/mL. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) la prueba Mann-Whitney Rank Sum Test.

Una vez determinado los parámetros inmunológicos en individuos politraumatizados y sanos, se procedió a cultivar la sangre en ausencia y en presencia del ODN 504 durante 48 h. Una vez finalizado este tiempo se tiñeron las células con los anticuerpos conjugados a fluorocromos antiCD19PE/antiCD40Fitc.

En el gráfico H16 se representan los resultados.

**Gráfico H16. Niveles de expresión del CD40 en células B, luego de cultivadas en ausencia o en presencia del ODN 504.**



CMSP humanas fueron obtenidas y teñidas al momento de recibir la sangre (Basal Trauma y Basal Sano). Luego las CMSP fueron estimuladas con el ODN 504PS 1.5µg/mL (504 Trauma; 504 Sano) o con medio RPMI (CN Trauma, CN Sano) durante 48h., luego las células fueron teñidas con anticuerpos conjugados a fluorocromos, anti-CD19-PE/anti-CD40-Fitc. El análisis de la citometría de flujo mostrado corresponde a los valores individuales de la media geométrica (Gm CD40 (Log) de cada individuo. El experimento fue repetido 3 veces con células de diferentes donantes. N= número de individuos totales analizados. El estadístico utilizado fue Mann-Whitney Rank Sum Test.

Los resultados demostraron que la sangre proveniente de los pacientes politraumatizados luego de 48 h de cultivo en presencia del ODN 504 (504 Trauma), aumentaron los niveles de este marcador a valores cercanos a los presentados por los individuos sanos (504 Sano). Estos resultados indican que la



inmunosupresión observada en los pacientes politraumatizados puede ser revertida *in vitro* con el agregado del ODN 504.

Vinculando los resultados obtenidos *in vivo* en nuestro modelo experimental (ratas de la cepa Sprague-Dawley) y los obtenidos *in vitro* en sangre proveniente de individuos politraumatizados, podemos inferir que el uso del ODN 504 ayudaría a revertir el estado inmunocomprometido que presentan los pacientes, lo cual sería de enorme utilidad, teniendo en cuenta que una de las mayores complicaciones observadas en estos pacientes es el aumento en la frecuencia de infecciones secundarias, derivadas en muchas ocasiones de los procedimientos realizados en la unidad de cuidados intensivos.

## Capítulo I.

### Estudio del Receptor.

Los ODN's *PyNTTTTGT* comparten características con los ODN's CpG por ejemplo, activan en forma directa a los linfocitos B y a las pDC. Es decir que, al ser estimulados, los linfocitos B responden aumentando la densidad de moléculas co-estimuladoras en su superficie tales como CD80, CD86 y CD40 y moléculas que intervienen en la presentación antigénica como los complejos mayores de histocompatibilidad I y II (MHC-I y II). Además, secretan inmunoglobulina M (IgM), IL6 y aumenta su proliferación (68). Las pDC estimuladas con ODN's *PyNTTTTGT* (prototipo ODN 504) también aumentan sus moléculas co-estimuladoras y antígenos de activación. Sin embargo, y a diferencia de los ODN's CpG, los ODN's *PyNTTTTGT* no inducen la producción de interferones de tipo I (IFN  $\alpha$  y  $\beta$ ).

Una particularidad de los ODN's *PyNTTTTGT* (y no así los ODN's CpG) es que en presencia de IL-2 son capaces de estimular la producción del factor estimulante de las colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF), de IFN- $\gamma$  de TNF- $\alpha$  (179).

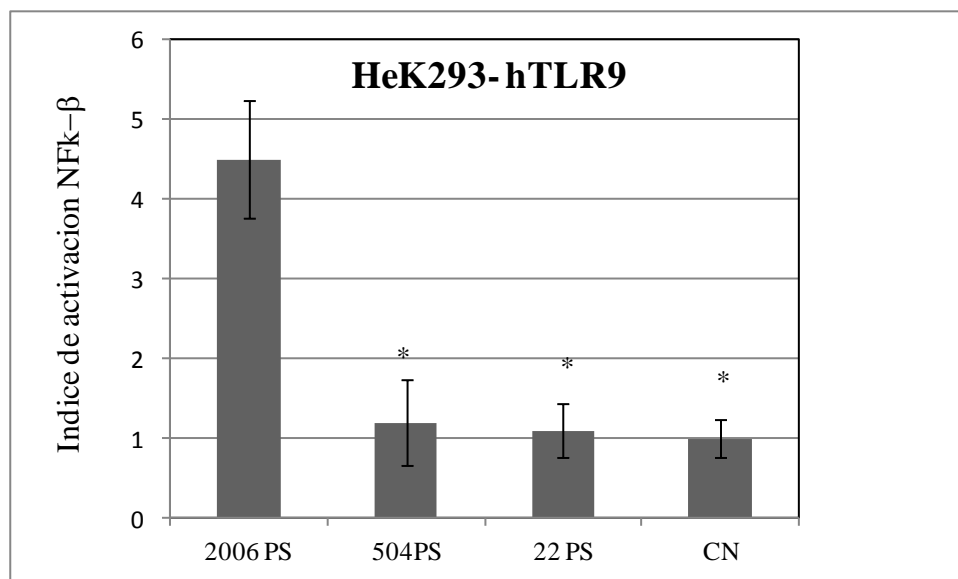
Otra diferencia importante entre los ODN's CpG y los *PyNTTTTGT* esta dada por el espectro de especies animales sensible a uno u otro grupo. Los ODN's CpG son activos en un amplio grupo de mamíferos como ratón, rata, vaca, cerdo, oveja, cabra, cobayo, primates humanos y no humanos, también en peces y aves. En cambio los ODN's *PyNTTTTGT* poseen principalmente actividad inmunoestimulante en primates, incluyendo humanos, y en rata.

En vista de las diferencias existentes entre los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* y CpG, en cuanto a ciertas respuestas biológicas que generan y a la especificidad de especie en las que son activos, nos propusimos investigar si dichas diferencias se encuentran a nivel del receptor.

Teniendo en cuenta que TLR-9 es considerado el receptor de los ODN-CpG (66) evaluamos *in vitro* el rol de este receptor en la actividad del ODN 504 (prototipo de oligo *PyNTTTTGT*). Más precisamente, se trabajó con la línea celular HEK (de sus siglas en inglés Human embryonic kidney 293 cells) 293/hTLR9. Estas células expresan constitutivamente hTLR-9 (Toll-like receptor 9) y se utilizan como modelo *in vitro* humano para el estudio y análisis del reconocimiento de los ligandos de diferentes TLR.

Para determinar la actividad de los ODN's se utilizó el sistema del gen reportero NF-kB-luciferasa con el que se detectó activación del factor de transcripción NFkB midiendo actividad de luciferasa, los resultados se muestran en el gráfico I1.

**Gráfico I1. Respuesta de los ODN's 2006, 504 y 22 en el sistema de gen reportero NFκB-Luciferasa HekTLR9.**

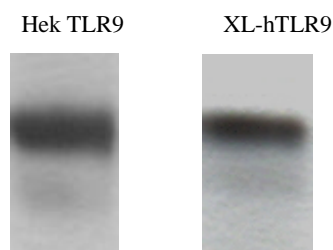


Estimulación de células Hek 293-hTLR9 transfectadas con Lipofectamina 2000 y los siguientes plásmidos: pGL2 NFκ-β Luc (plásmido reportero) y pCMV Sport β-galactosidasa. Al siguiente día las células fueron estimuladas con los diferentes oligos PS en una concentración de 15μg/mL o medio de cultivo (CN, control negativo) 24h después de estimular con los oligos las células fueron lisadas y centrifugadas. En el sobrenadante obtenido se determinó la actividad Luciferasa utilizando un kit comercial (Promega). Las muestras fueron leídas en un luminómetro (Luminometer Hidex 425-014, Turku, Finland) durante 1 minuto. Las barras representan el promedio del índice de activación con respecto al CN ± el desvío estándar. El asterisco (\*) indica la diferencia significativa ( $p < 0,0001$ ) utilizando la prueba t de Student.

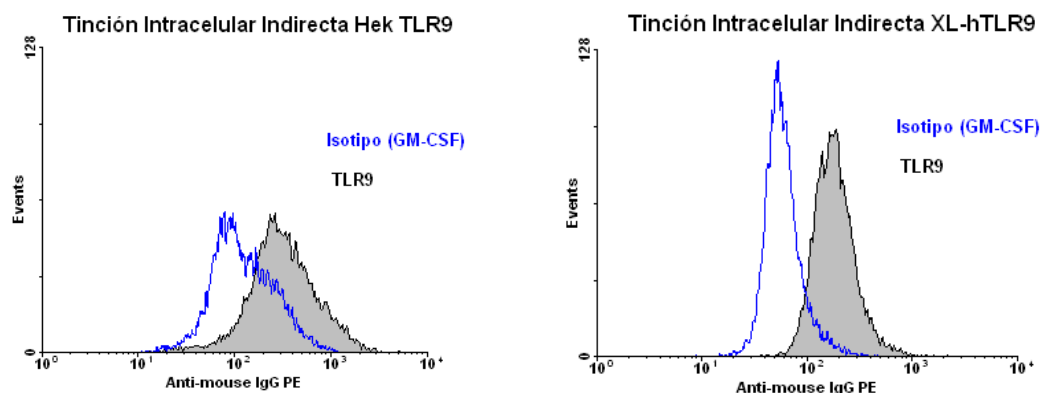
Como se observa en el gráfico anterior, el único oligonucleótido con el cual se obtuvo una respuesta celular clara al estimular a las células HEK 293-hTLR-9, fue el ODN CpG 2006. Este ensayo también se realizó con la línea celular Hek293-hTLR7 y tampoco se observó una estimulación con el ODN 504 (datos no mostrados).

Cabe remarcar que la línea celular Hek293-hTLR9 fue cedida por el ya mencionado grupo de investigación de M.D. Klinman, uno de los grupos con más trayectoria en el tema oligonucleótidos inmunoestimulantes. Luego compramos a la empresa Invivogen la línea celular 293-XL-hTLR9. Los resultados con ambas líneas celulares fueron similares.

A continuación se verificó la expresión de hTLR9 en las líneas celulares Hek293-hTLR9 y 293-XL-hTLR9 por dos metodologías, western blot (figura I1) y citometría de flujo (gráfico I2).

**Figura I1. Western Blot de TLR9 de las líneas celulares Hek TLR9 y XL-hTLR-9**

Western Blot de TLR-9 con proteína total (menos nucleares) de las líneas celulares Hek TLR9 y XL-TLR-9. Las bandas obtenidas fueron del tamaño esperado (~120 KDa).

**Gráfico I2. Tinción intracelular indirecta anti TLR9 de las líneas celulares Hek TLR-9 y XL-hTLR-9.**

Tinción intracelular indirecta anti TLR-9 de las líneas celulares Hek TLR-9 y XL-hTLR-9. Como control de isotipo se usó un anticuerpo mouse anti rat GMC-SF.

Estos resultados confirman la expresión del hTLR-9 en ambas líneas celulares.

Con el objetivo de encontrar si algún TLR era el receptor del ODN 504 se decidió hacer un screening para ver si alguno de los otros miembros de la familia de los TLR funciona como receptor de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT*. El ensayo lo realizó la empresa Invivogen. Se enviaron diferentes ODN's pero en ningún momento se notificó a la empresa acerca de la naturaleza de las muestras (ciegos simples).

La actividad de los ODN's 504, 2006 y 2216 sobre los TLR-2, 3, 4, 5, 7, 8 y 9 se probó midiendo la activación de NF- $\kappa$ B en células Hek293 que expresaban establemente los diferentes hTLR. Se estimuló con los ODN's en una concentración de 15 $\mu$ g/mL y los resultados se compararon con los obtenidos al

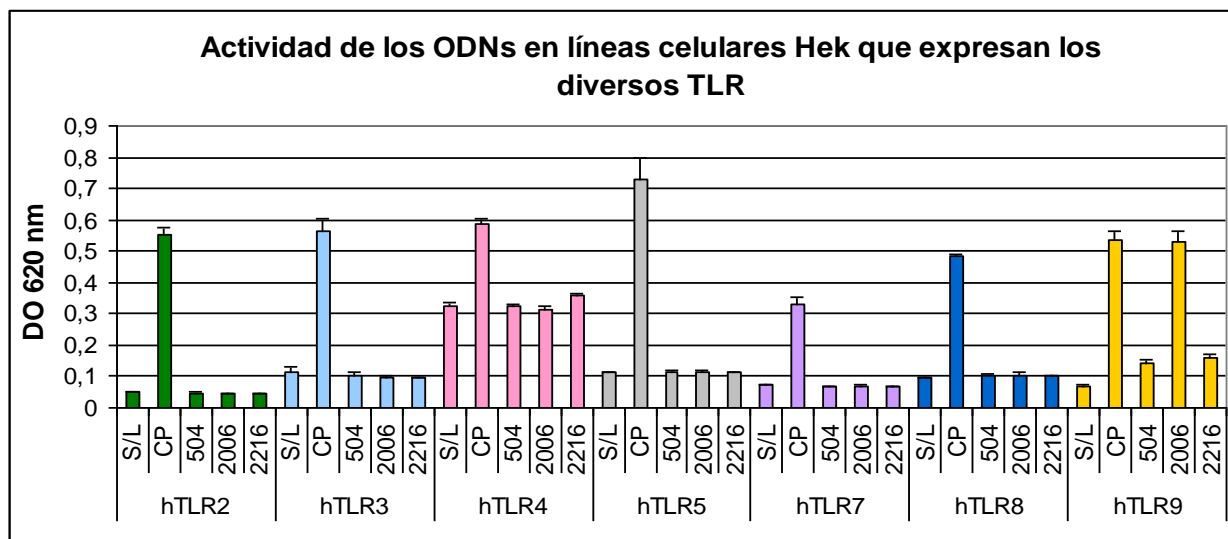
estimar a las diferentes líneas celulares con sus correspondientes ligandos (controles positivos), tabla II. Cada condición se realizó por triplicado. Los resultados se presentan como valores de densidad óptica (absorbancia a 620 nm), gráfico I3.

**Tabla II. Controles positivos de las líneas celulares TLR2/3/4/5/7/8 y 9 (Invivogen).**

Toll Like Receptor	Ligando (C/P)	Concentración
TLR2	HKLM (heat-killed <i>Listeria monocytogenes</i> )	10 <sup>8</sup> cells/ml
TLR3	Poly(I:C)	25 µg/ml
TLR4	<i>E. coli</i> K12 LPS	50 µg/ml
TLR5	<i>S. typhimurium</i> flagellin	1 µg/ml
TLR7	Loxoribine	1 mM
TLR8	ssPolyU/LyoVec	50 µg/ml
TLR9	CpG ODN 2006	10 µg/ml

Ligandos utilizados como controles positivos (C/P) de actividad de los diferentes TLRx y sus respectivas concentraciones.

**Gráfico I3. Actividad de diferentes ODN's en Hek293-hTLR2/3/4/5/7/8 y 9.**



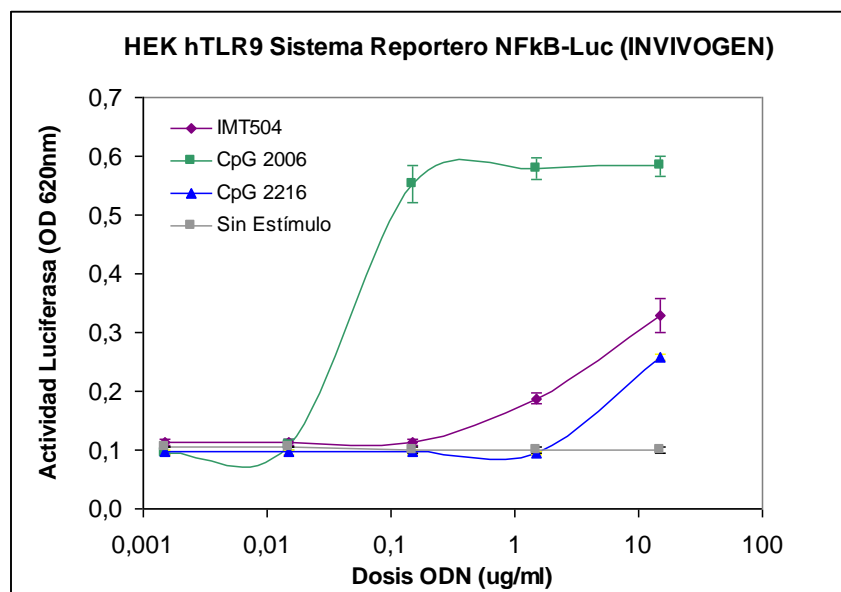
Actividad de los oligonucleótidos en las líneas celulares Hek que expresan establemente los distintos TLR (medido con el sistema reportero NFκB-Luciferasa). S/L= sin ligando y CP= Control positivo. Los CP para las diferentes líneas fueron: heat-killed *Listeria monocytogenes* (10<sup>8</sup> cells/ml) para hTLR2; Poly I:C (25 µg/ml) para hTLR3; *E. coli* K12 LPS (50 µg/ml) para hTLR4; *S. typhimurium* flagellin (1 µg/ml) para hTLR5; Loxoribine (1 mM) para hTLR7; ssPolyU/LyoVec (50 µg/ml) para hTLR8 y ODN CpG 2006 (10 µg/ml) para hTLR-9. Los oligonucleótidos 504, 2006 y 2216 se utilizaron en concentración 15µg/mL. Las barras representan el promedio por triplicado de los valores de D.O a 620nm. mas el desvío estándar.

Los resultados demuestran que más allá de la línea Hek TLR-9 (hTLR-9), en ninguna de las demás líneas celulares hubo un aumento de la actividad para ninguno de los oligonucleótidos testeados. Además, sólo el ODN CpG 2006 demostró tener actividad en esta línea celular (hTLR-9).

El ODN CpG 2216 no fue activo en la línea celular hTLR-9, este dato es llamativo debido a que éste es un oligonucleótido CpG y la inactividad del mismo en células que expresan el hTLR-9, contradice la creencia que el TLR-9 es necesario y suficiente para transformar en respondedoras a células que no lo son frente al estímulo con los ODN CpG (76, 77, 180, 181, 182, 183, 184, 185).

Por otro lado, teniendo en cuenta que en el ensayo anterior se utilizó una sola concentración de los ODN's (15µg/mL-2µM), se evaluó por la misma metodología una dosis respuesta, este ensayo también fue realizado por la empresa Invivogen, gráfico I4.

**Gráfico I4. Dosis-Respuesta del ODN 504 y los ODN CpG 2006 y 2216 en Hek293-hTLR-9.**



Curva dosis respuesta de los ODN's 504 (IMT 504), CpG 2006 y CpG 2216 en el sistema de gen reportero NFκB-Luciferasa (HekTLR-9).

Como se observa en el gráfico anterior, el ODN CpG 2006 activó fuertemente a las células Hek293-hTLR-9. Al mismo tiempo se vió una pequeña dosis respuesta para el ODN 504 y se detectó una leve actividad con el 2216 (únicamente con la mayor concentración). Sin embargo, la respuesta obtenida con estos oligonucleótidos no es comparable con la del 2006, mientras que el ODN 2006 aumentó notoriamente la expresión del factor de transcripción, llegando a la saturación de actividad de luciferasa con una concentración de 0,15µg/mL de oligonucleótido, con el ODN 504 se ve una pequeña dosis

respuesta que aún con una concentración 100 veces mayor no alcanzó los valores de actividad obtenidos por el 2006.

Por lo tanto, teniendo en cuenta que el ODN 504 y el ODNCpG 2216 activaron marginalmente a las Hek TLR-9, la escasa actividad de ambos oligonucleótidos en células que expresan el hTLR-9 podría significar dos cosas:

- El hTLR-9 por sí solo no es el receptor de los ODN's *PyNTTTTGT* ni de los CpG, más allá de uno en particular (el 2006).
- El modelo *in vitro* humano utilizado no es válido para analizar la actividad de los ODN inmunoestimulantes.

Con el ánimo de evaluar si sólo el ODN CpG 2216, prototipo clase A es el único ODN CpG que no activa hTLR-9. Se estimuló a las Hek TLR-9 con otros ODN's CpG pertenecientes a tres clases de oligonucleótidos CpG (A/B y C) y se determinó la concentración de IL-8 en los sobrenadantes de cultivos.

El siguiente resultado fue realizado por Andrea Ziblat, la cual realizó un extenso trabajo de investigación sobre este tema como tesina de licenciatura.

En la tabla I2 se muestran todos los oligonucleótidos inmunoestimulantes que fueron probados en el modelo de activación de secreción de IL-8, con sus respectivas secuencias, aclarando la clase de oligonucleótido a la que pertenecen.

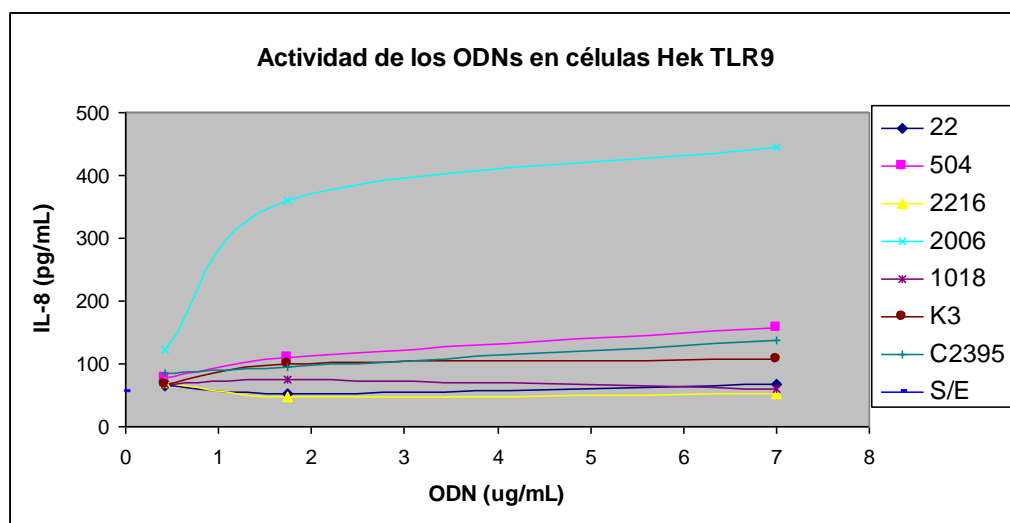
**Tabla I2. Dosis-Respuesta del ODN 504 y los ODN's CpG 2006 y 2216 en Hek293-hTLR-9.**

ODN	Secuencia	Clase de ODN
22	TGC TGC AAA AGA GCA AAA GAG CAA	Inactivo
504	TCA TCA TTT TGT CAT TTT GTC ATT	<i>PyNTTTTGT</i>
2216	GGG gga cga tcg tcGGGGGG	CpG-A
2006	TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTC	CpG-B
1018	TGA CTG TGA ACG TTC GAG ATG A	CpG-B
K3	ATC GAC TCT CGA GCG TTC TC	CpG-B
C2395	TCG TCG TTT TCG GCG CGC GCC G	CpG-C

Los ODN's inmunoestimulantes con los que se estimularon las células Hek TLR-9, con sus respectivas secuencias, la clase de oligonucleótido a la que pertenecen. Las letras que aparecen en minúsculas corresponden a nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster, mientras que en mayúsculas significan enlaces fosfotioato.

Como se observa en el gráfico I5, habiendo estimulado a las células con oligonucleótidos pertenecientes a las tres clases (A, B y C) sorpresivamente ninguno, salvo el 2006, generó una respuesta celular.

**Gráfico I5. Secreción de IL-8 en Hek293-hTLR-9 estimuladas con diferentes ODN's CpG clase A/B /C Dosis y PyNTTTTGT.**



Estimulación de células Hek TLR9 con diferentes clases de ODN's en concentraciones 0.44; 1.75 y 7 ug/mL. S/E células sin estimular.

En función de estos resultados podemos concluir que este modelo experimental no es el apropiado para analizar la actividad de oligonucleótidos inmunoestimulantes, a excepción del ODN clase B 2006.



## *Discusión*

## Discusión.

La principal característica de los organismos vivos es la preservación de su homeostasis. En consecuencia, el sistema inmune debió evolucionar para trabajar en la reparación y restauración de la misma. Bajo esta premisa, resulta lógico pensar que diferentes moléculas internas o endógenas que se generan durante la ruptura de la homeostasis, puedan ser utilizadas por el sistema inmune con el objetivo de activar diferentes mecanismos de reparación. Con este concepto, nuestro grupo de trabajo se propuso estudiar el rol de la molécula de ADN y su vinculación con el sistema inmune de los vertebrados.

Luego de 11 años del primer reporte del ADN como molécula inmunoestimulante (52, 54), Krieg y Klinman establecieron el paradigma de los oligonucleótidos con “motivos CpG” como las únicas secuencias de oligonucleótidos (ODN's) activos en el sistema inmune de los vertebrados (60). En consecuencia, los ODN's CpG rápidamente se postularon y establecieron como moléculas PAMP's en su carácter de simular al ADN bacteriano, y fueron propuestos como moléculas novedosas para el tratamiento de numerosas enfermedades infecciosas, como adyuvantes de vacunas, tratamiento de alergias y cáncer (105, 123, 124, 125, 186, 187, 188, 189, 190).

Aproximadamente seis años más tarde del descubrimiento de los ODN's CpG, en nuestro laboratorio descubrimos la actividad de un oligonucleótido sin motivos CpG el cual denominamos ODN 21. El diseño del ODN 21 se basó en la secuencia del CpG ODN 2006 pero con todos sus pares CpG invertidos. Resultó sorprendente que en los experimentos publicados por Krieg y Klinman en 1995 y posteriores, no hubiesen incluido un oligonucleótido como control invirtiendo el par CG.

En el año 2002 Vollmer y Krieg (191) publican un trabajo en cual evalúan la actividad de oligonucleótidos sin motivos CpG, a los cuales denominaron “oligonucleótidos libres de CpG” (CpG-Free Oligonucleotides). En este trabajo, testearon la actividad de un oligonucleótido al cual denominaron ODN 2137 en cuya secuencia invirtieron el par CG del ODN 2006, por lo tanto esta secuencia era exactamente igual al ODN denominado por nosotros 21. También utilizaron un oligonucleótido al que metilaron las citosinas de los pares CG del ODN 2006, el ODN 2117. Estos autores reportaron la actividad en células mononucleares de sangre periférica humana de ambos oligonucleótidos, y concluyeron que “...los efectos inducidos por el ODN 2137 y el ODN 2117 en células humanas son más débiles con respecto a la actividad presentada por el ODN 2006”. Para nosotros, los resultados de estos dos oligonucleótidos daban claros indicios de la modificación del paradigma de los ODN's CpG, debido a que no es necesaria la presencia de dinucleótidos CpG para que los oligonucleótidos tengan actividad inmunoestimulante. Sin embargo,

Vollmer y Krieg minimizaron la importancia de estos resultados mencionando solamente el porcentaje de actividad respecto al ODN 2006, el cual fue del orden del 79-45% determinado por la expresión de la molécula CD86 en células B CD19<sup>+</sup>.

Esto es un ejemplo de como en ocasiones en ciencia, con el ánimo de continuar sosteniendo paradigmas establecidos o por querer establecer paradigmas, se subestiman o ignoran resultados los cuales pueden modificar y/o ampliar conceptos. De todos modos, sus “omisiones” nos condujeron a establecer una línea de investigación en la cual, a partir del análisis minucioso de cientos de oligonucleótidos, definimos una sub-familia sin motivos CpG activa en el sistema inmune de los vertebrados.

El estudio estructural de estos oligonucleótidos nos permitió establecer: i) el motivo responsable de la actividad inmunoestimulante en humanos; ii) la composición nucleotídica óptima del motivo; iii) el tamaño mínimo de la molécula con actividad inmunoestimulante; iv) la posición óptima del motivo y v) la constitución de nucleótidos en los extremos 5' y 3' fuera de los motivos activos (67). De esta manera, para un oligonucleótido de 24 nucleótidos de longitud, su secuencia quedaría constituida de la siguiente forma:



Donde: N es una A, T, C o G. Py es una C o T. Entre paréntesis los nucleótidos que más influyen en la actividad inmunoestimulante. Se requiere un tamaño mínimo de 16 nucleótidos para PyN(T/A)(T/C/G)(T/C/G) (T/G) GT ODN's y la máxima actividad se alcanza con oligonucleótidos de 20-30 nucleótidos de longitud. Cabe mencionar que queda pendiente el análisis de las combinaciones de nucleótidos fuera del motivo en los extremos 5' y 3', lo cual pueden dar origen a diferentes secuencias según lo sugerido por algunos trabajos sobre ODN's CpG (192, 193).

A fin de estudiar la actividad sobre las diferentes poblaciones celulares puras, de esta extensa sub-familia de oligonucleótidos, elegimos el ODN 504 el cual posee dos motivos CATTTTGT, como prototipo de los ODN's *PyNTTTTGT*.

El ODN 504 activa en forma directa a las células B (CD19<sup>+</sup>) aumentando la expresión de las moléculas CD 86, CD 40, MHC I/MHC II y secreción de IL-6 e IgM. La activación de células B puras, al igual que en células mononucleares de sangre periférica, se obtiene aún con ODN's conteniendo una versión relajada del motivo *PyNTTTTGT*. Por ejemplo, en el ODN 53 se reemplazó la G del motivo PyNTTTTGT por una T (TTTTTTTT) y se encontró actividad en su versión fosfotioato (PS). En el caso del ODN 21, se reemplazó la T (de **Py**) por una G (GCTTTTGT) y también presentó estimulación en su versión PS. Sin embargo, la actividad de ambos oligonucleótidos fue abolida en sus versiones fosfodiéster

(PO). Diferentes resultados fueron reportados por Vollmer para el ODN 53 PO, al cual denominaron ODN 5135, que indujo poca estimulación en células mononucleares de sangre periférica humana (191).

Además, cuando las uniones son PS, tanto para los ODN's CpG como para los *PyNTTTTGT*, se observó estimulación a menor concentración que la utilizada con los ODN's PO. Estos datos fueron reportados previamente por diferentes grupos (64, 194) y sugieren que si las uniones son PO, se debe respetar estrictamente el motivo *PyNTTTTGT*. Seguramente, esto se debe a que la dosis que permanece activa es menor, debido a su degradación. Asimismo, cuando se realizaron las curvas dosis-respuesta con oligonucleótidos PS, el ODN 21 (el cual es defectivo en un nucleótido), presentó menor actividad a bajas concentraciones con respecto a los oligonucleótidos 2006 y 504. Por lo tanto, si el motivo no es estricto, la actividad disminuye en relación a oligonucleótidos con el motivo completo conforme a la dosis.

Otra de las poblaciones estimuladas por el ODN 504 fueron las células dendríticas plasmacitoides (pDC). Al igual que los ODN CpG 2006, estos oligonucleótidos no estimulan a las células dendríticas del linaje mielóide (184).

La actividad inmunoestimulante de los ODN's *PyNTTTTGT* en linfocitos B y en células dendríticas plasmacitoides es directa, al igual que la actividad del ODN CpG 2006, previamente reportada por diferentes grupos (60, 64, 184, 195, 196; 197).

Nuestro grupo de trabajo (179) reportó que sólo los ODN's *PyNTTTTGT* estimulan la secreción de GMC-SF en presencia de IL-2, siendo las células  $CD56^+ / NKT (CD56^+CD3^+)$  y  $NK (CD56^+CD3^-)$  (brighth or dim) las principales poblaciones celulares responsables de la secreción de esta citoquina. Además, tanto los ODN's CpG como los *PyNTTTTGT* son capaces de inducir la secreción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , también en presencia de IL-2 en CMSP (179).

El efecto inmunoestimulante del ODN 504 en células B y pDC, consistió en una clara activación del fenotipo de célula presentadora de antígeno (CPA), lo cual llevaría a que en presencia de un estímulo antigénico adecuado, se desencadene una respuesta inmune adaptativa.

Los resultados *in vitro* obtenidos por los ODN's *PyNTTTTGT* nos llevaron a pensar en la utilización de estos oligonucleótidos como adyuvantes.

En la actualidad, la alúmina es el adyuvante más común en vacunas humanas, habiéndose utilizado por casi un siglo (198, 199) y hasta el 2009, fue el único adyuvante empleado en la mayoría de las vacunas de uso humano en el mundo. Hay que tener en cuenta que en la búsqueda de nuevos adyuvantes existen diferentes causas por las cuales en muchas ocasiones se dificulta el hallazgo de alternativas a la alúmina. Por un lado, tenemos que las diferentes vacunas de los principales laboratorios representan una

proporción mínima de su facturación, y por otro lado la seguridad que requiere una vacuna es mayor a la de un medicamento, ya que se suministra a personas sanas. Además, hay que considerar que la magnitud de la respuesta inmune para que una vacuna sea efectiva debe ser lo suficientemente elevada y al mismo tiempo estar dentro de los límites, por encima de los cuales, deja de ser segura.

En los últimos años se realizaron varias pruebas clínicas con diferentes adyuvantes en vacunas. GlaxoSmithKline Biological utilizó el adyuvante QS21/MPL junto al virus de Hepatitis B (VHB) (199b) y, si bien se obtuvieron valores elevados de anticuerpos seroprotectores el ensayo clínico fue detenido por la FDA (de sus siglas en inglés Food & Drug Administration U.S.) debido al reporte de efectos adversos presentados en la mayoría de los individuos (200).

Otro de los adyuvantes evaluados desde el año 2003 a la actualidad, fueron los ODN CpG, 7909 (2006) o 1018 ISS (123, 124, 125). En el año 2008, la FDA interrumpió el estudio (fase III) de Heplisav-B (vacuna Hepatitis B (Dynavax)) combinado con el ODN 1018 ISS, debido al diagnóstico presentado por un individuo con granulomatosis de Wegener, una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación vascular, luego de recibir dos dosis de la vacuna más el adyuvante (201). A principios del 2013, la FDA nuevamente rechazó la vacuna Heplisav-B y, finalmente en noviembre del 2017, el Comité Asesor de vacunas y productos biológicos de la FDA aprobó la vacuna Heplisav-B, solo para su uso en adultos mayores de 18 años.

En pacientes HIV positivos vacunados con el virus de Hepatitis B junto al ODN CpG 2006, se observó una disminución progresiva transitoria en el recuento de células T CD4, luego de la administración de cada dosis (202, 203).

Los efectos secundarios de los adyuvantes se encuentran estrechamente vinculados al desencadenamiento de las funciones inflamatorias en el individuo que, si bien en un principio son necesarias para obtener una buena respuesta protectora, la permanencia de las mismas conducen al establecimiento de patologías no deseadas. En este punto, hay que pensar que si bien no está claro cuál es el causante de los efectos adversos reportados en las pruebas clínicas, hay que considerar que existen algunas citoquinas, como por ejemplo el IFN- $\alpha$  con estrecha relación en la generación de algunas enfermedades inmunológicas como el lupus eritomatoso (204, 205). Recientemente, se reportó que la inducción de IFN- $\lambda$ 1 (un subtipo de la familia IFN tipo I) en la infección por el virus del dengue, está relacionada a los procesos de inmunopatogénesis presentados durante el desarrollo de la enfermedad (206). Por lo tanto, la falta de regulación de IFN tipo I genera una fuerte sintomatología clínica.

Cuando nosotros estudiamos comparativamente las bases que componen oligonucleótidos con el motivo *PyNTTTTGT* y el ODN CpG 2006, se evidenció la presencia de dos motivos inmunoestimulantes en este último. Por un lado, la presencia de dos TCG sucesivos en el extremo 5' es capaz de activar a las células B (índice de proliferación), células NK (CD69<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup>) y células dendríticas plasmacitoides (pDC). Similares resultados fueron reportados por Liang y colaboradores (207) que señalaron la importancia de la presencia de los trinucleótidos TCG para alcanzar la máxima actividad de oligonucleótidos CpG PS en células B humanas. Por otro lado, encontramos que el ODN 2006 posee además, dos motivos *PyNTTTTGT* representados por la secuencia CGTTTTGT los cuales también inducen la activación y proliferación en células B y la activación de pDC. Ambos motivos fueron capaces de estimular pDC pero sólo los oligonucleótidos que poseen dos TCG sucesivos en el extremo 5' fueron responsables de estimular a las pDC a secretar IFN- $\alpha$ . Además, el ODN 518 el cual contiene solo trinucleótidos TCG, induce a la producción de una mayor cantidad de IFN- $\alpha$  con respecto al ODN 2006.

También observamos que la producción de IFN- $\alpha$  en células dendríticas plasmacitoides inducidas por los ODN CpG, disminuyó de manera dosis-dependiente con el agregado del ODN 504 (179). Por lo tanto, la causa de la baja inducción de la producción de IFN- $\alpha$  por parte del ODN 2006 pareciera ser que se debe a que el motivo *PyNTTTTGT*, que está en este oligonucleótido, inhibe la inducción de IFN- $\alpha$  por parte de los motivos TCG. De esta manera, cuando se elimina el motivo *PyNTTTTGT* (ODN 518), la capacidad de inducción de IFN- $\alpha$  aumenta.

Estos resultados nos ponen en una situación optimista, debido a que contar con una molécula que induzca buenos niveles de respuesta inmune sin la producción de IFN- $\alpha$ , el cual es indicador de procesos inflamatorios, es una clara ventaja.

En función de lo expuesto y con el objetivo de poder evaluar y caracterizar la actividad de estos oligonucleótidos *in vivo* evaluamos la actividad inmunoestimulante *in vitro* en diferentes especies de mamíferos. Encontramos que la especie más respondedora es la humana, seguida de los primates no humanos, y dentro de este grupo, la especie *Papio hamadryas* presentó la mayor actividad de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT* (68). Este resultado es esperable, dado que esta especie de mono pertenece al grupo de los monos Catarrinos (monos del Viejo Mundo), que se encuentra filogenéticamente más próximo al humano (208).

En ratón no se observó inmunoestimulación por parte de ninguno de los ODN's *PyNTTTTGT* testeados. Además, la actividad del ODN 504 se testeó *in vivo* junto al antígeno de hepatitis B (HBsAg), y solo el ODN CpG 1826 (ODN CpG clase B) evidenció un marcado aumento en el título de anticuerpos

séricos, conforme a lo descrito por otros autores (77, 209). En consecuencia, la especie ratón no fue utilizada para evaluar el efecto adyuvante de los ODN's *PyNTTTTGT*.

Como modelo experimental utilizamos a primates no humanos y ratas. Además, realizamos un pequeño estudio piloto en humanos para evaluar el efecto adyuvante del ODN 504 hacia diferentes vacunas con relevancia epidemiológica a nivel mundial.

La primera vacuna en ser evaluada fue la de Hepatitis B. La vacunación contra el virus de Hepatitis B se recomienda en todo el mundo (118, 119) y, tres dosis son necesarias (0,1 y 6 meses) para generar protección en el 92-95% de los individuos vacunados (210). En los países subdesarrollados, la morbilidad y mortalidad asociada a la infección por el virus de hepatitis B es elevada. Por ejemplo, la mayoría de los casos de carcinoma hepatocelular (aproximadamente el 80%) está asociada a la infección crónica por el virus de hepatitis B o hepatitis C (211). Esto se debe principalmente, al fracaso en completar el calendario de vacunas de tres dosis (en particular la tercera dosis), por lo tanto disminuir el número de dosis de la vacuna sería muy útil. Además, hay personas que no responden a las vacunas actuales, como por ejemplo los ancianos, obesos, fumadores y personas inmunodeficientes (120, 212).

Otra de las enfermedades que presenta morbilidad moderada a grave es la causada por el virus de Hepatitis A (VHA). Aproximadamente 1,5 millones de personas son infectadas anualmente con el VHA (213), aunque esta cifra probablemente se encuentre subestimada debido a la presentación asintomática de la infección por el virus de Hepatitis A. Las epidemias asociadas a alimentos o agua contaminados con el VHA pueden aparecer de forma explosiva, como la epidemia registrada en Shangai en 1988, que afectó a unas 300.000 personas (214).

La severidad de la infección por el virus de Hepatitis A en los individuos infectados está fuertemente relacionada con la edad. Mientras que en los niños pequeños la infección no presenta síntomas (asintomática), con frecuencia los niños mayores y adultos presentan síntomas de la enfermedad (215). En raras ocasiones la infección también puede causar insuficiencia hepática aguda seguida de muerte y este riesgo aumenta con la edad (216).

Se pueden distinguir zonas geográficas de nivel elevado, intermedio o bajo de infección por el VHA. En regiones que presentan un nivel intermedio o bajo de endemicidad del VHA como Asia, América Latina, Europa Oriental y Medio Oriente podrían beneficiarse con un incremento del uso de las vacunas de Hepatitis A (127, 128).

La siguiente enfermedad infecciosa con relevancia epidemiológica evaluada junto al ODN 504 fue el virus de la rabia. La rabia es una enfermedad que causa encefalitis en humanos con una tasa de mortalidad aproximadamente del 100% (133, 134). Cada año entre 50.000 y 80.000 personas mueren por esta enfermedad, y más del 99% de ellas ocurren en países subdesarrollados, principalmente en África y Asia (95).

Originalmente, las vacunas antirrábicas para uso humano se preparaban con tejido nervioso de animales inoculados intracranalmente con el virus de la rabia. Teniendo en cuenta su pobre inmunogenicidad y sus efectos adversos la Organización Mundial de la Salud (OMS) discontinuó el uso de estas vacunas. Actualmente, las vacunas de la rabia utilizadas para la profilaxis humana provienen de cultivo celular y son formuladas con virus de la rabia inactivado (VRI) con o sin alúmina. Estas vacunas son más seguras que las vacunas de cerebro de ratón y eficaces en inducir anticuerpos neutralizantes anti el virus de la rabia (AbNVR, de sus siglas en inglés Antibody Neutralizing Virus Rabies) (217). Sin embargo, las vacunas de cultivo celular sin alúmina tienen algunas desventajas, por ejemplo no generan una respuesta alta de AbNVR en la primera fase de vacunación, y no inducen protección en pacientes pocos respondedores (218). El agregado de alúmina si bien produce un elevado aumento de AbNVR (219, 220), retarda la producción de los mismos (217, 221).

Por último, evaluamos la vacuna de la gripe. La influenza (gripe) es una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en época invernal en el mundo. Los más propensos a morir de la infección de la gripe son los niños, ancianos, personas con enfermedades crónicas preexistentes y pacientes inmunosuprimidos (141, 142). En el mundo la esperanza de vida en las personas de edad avanzada ha aumentado notablemente en las últimas décadas. La población global está envejeciendo con un aumento constante de los individuos mayores de 60 años, por lo que se espera que estos representen más del 20% de la población mundial en el año 2050 (222). En países desarrollados, en la actualidad, esta franja etárea se encuentra entre el 20-25% (223).

Cabe destacar además que la variación antigénica presentada por las proteínas virales Hemaglutinina (HA) y Neuroaminidasa (NA) constituyen la principal causa de fracaso de las vacunas comerciales, como se observó durante las epidemias de influenza en el 2003-2004 (143). No cabe duda que la gripe sigue siendo claramente, una amenaza importante para la salud humana.

El desarrollo de una vacuna efectiva contra el virus de la gripe, además de ser eficiente en las poblaciones antes mencionadas, debería generar protección cruzada hacia cepas virales no incluidas en la



vacuna. Por último, frente a una epidemia, el número de vacunas de Influenza necesarias aumenta significativamente, por lo que sería de gran utilidad que el agregado de un adyuvante permita utilizar una menor cantidad de antígeno sin perder las características protectivas de la vacuna.

Teniendo como referencia lo expuesto anteriormente, estudiamos el ODN 504 (prototipo *PyNTTTTGT*) en cada una de las vacunas mencionadas y pudimos observar claramente la capacidad inmunoestimulante del oligonucleótido en al menos seis aspectos diferentes:

- 1) Aumento de la respuesta.
- 2) Disminución del tiempo de la respuesta.
- 3) Disminución de la cantidad de antígeno necesaria.
- 4) Aumento de la diversidad de la respuesta.
- 5) Incremento de la respuesta en inmuno-comprometidos.
- 6) Mantenimiento de las células B de memoria.

A continuación se discuten los resultados en relación a cada uno de estos puntos.

### ***1- Aumento de la respuesta***

El ***aumento de la respuesta*** se evidenció en diferentes protocolos experimentales realizados en humanos, monos y ratas, utilizando el ODN 504 junto a las vacunas comerciales de Hepatitis B, Hepatitis A, Rabia e Influenza.

La inmunización de la vacuna comercial AgB<sup>®</sup> con el ODN 504 en monos *Cebus apella*, presentó un aumento en el título de anticuerpos durante todo el tiempo de estudio con respecto a los animales que recibieron la vacuna sin el oligonucleótido. En promedio, los niveles de anticuerpos aumentaron 19 veces luego de dos semanas de la primera dosis. A partir de este tiempo, la respuesta se mantuvo elevada aproximadamente entre 5 y 8 veces con respecto a los animales inmunizados en ausencia del ODN 504. Resultados similares fueron reportados en primates no humanos utilizando la vacuna comercial Engerix<sup>®</sup> en presencia del ODN 2006 (224, 225, 226).

En ratas Sprague-Dawley, la actividad adyuvante del ODN 504 se evidenció cuando en la formulación se incluyó una alta concentración de alúmina. Bajo esta condición la respuesta sérica de anticuerpos específicos anti el HBsAg aumentó aproximadamente cuatro veces con respecto al grupo que

no recibió el oligonucleótido. Además, se observó un predominio de la respuesta IgG<sub>2b</sub>/IgG total acompañado de un aumento de IFN- $\gamma$  (91).

Con una segunda dosis (booster) del ODN 504, en un esquema de inmunización heteróloga de Hepatitis B, la respuesta de anticuerpos aumentó aproximadamente 5 veces, con respecto a la administración de un booster en presencia de alúmina.

La evaluación de la actividad del ODN 504 en ratas Sprague-Dawley adultas jóvenes junto a dos formulaciones diferentes de vacunas comerciales del virus de Influenza, Inflexal<sup>®</sup> (viroosomal) o Fluarix<sup>®</sup> (virus inactivado), reflejó un aumento en el título de anticuerpos aproximadamente 13 y 40 veces respectivamente, en comparación a los animales que no recibieron el adyuvante (106).

La eficiencia de la vacunación para la prevención de esta enfermedad varía entre el 60-90% (227, 228) en individuos adultos sanos, disminuyendo considerablemente este porcentaje en individuos de edad avanzada (23-70%) (229, 230). Cuando evaluamos la actividad del ODN 504 junto a la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V en ratas ancianas la respuesta de anticuerpos aumentó en promedio 16 veces más en estos animales (106).

La evaluación del efecto inmunoestimulante del ODN 504 junto a la vacuna antirrábica VeroRab<sup>®</sup> en ratas Sprague Dawley se manifestó en un aumento de anticuerpos equivalente a 3 o 6 veces más, dependiendo de la dilución de la vacuna utilizada. Además, mediante un ensayo de desafío con el virus vivo en estos animales se demostró la presencia de anticuerpos neutralizantes.

En humanos, el agregado del ODN 504 a la vacuna VeroRab<sup>®</sup> generó en promedio un aumento de hasta 10 (diez) veces los niveles de anticuerpos neutralizantes con respecto a los individuos que recibieron la vacuna en ausencia del oligonucleótido.

En función de los resultados obtenidos podemos concluir que el agregado del ODN 504 a diferentes formulaciones de vacunas comerciales incrementó la respuesta específica de anticuerpos, reflejándose también en un aumento de los anticuerpos neutralizantes.

## **2- Disminución del tiempo de la respuesta**

Los niveles de anticuerpos protectivos, específicos hacia el antígeno recombinante de Hepatitis B (HBsAg) en monos *Cebus apella*, se obtuvieron en un período de tiempo menor en los animales inmunizados con la vacuna AgB<sup>®</sup> más el ODN 504. Dos semanas, luego de recibir la primera dosis, fue

suficiente para que el 100% de los animales sero-convirtieran. Sin embargo, una segunda dosis fue necesaria para que todos los animales del grupo control presenten valores de anticuerpos seroprotectores.

Cuando se utilizó la vacuna anti Hepatitis A (HAVRIX<sup>®</sup>) en monos *Cebus apella*, la actividad del ODN 504 se reflejó en un aumento de reactividad creciente de anticuerpos específicos anti el virus de Hepatitis A en un período de tiempo menor con respecto a los animales que recibieron la vacuna en ausencia del ODN 504. En la semana 6 (dos semanas luego de recibir el booster), el grupo que recibió el ODN 504 presentó un 100% de reactividad comparado a un 50% del grupo control.

En humanos, la respuesta sérica de anticuerpos protectivos hacia la vacuna VeroRab<sup>®</sup> fue cuantitativamente mayor y, además se generó en menor tiempo en presencia del ODN 504.

La acción del ODN 504 junto a la vacuna anti Hepatitis B o A o antirrábica ayudaría a alcanzar niveles de protección en un período de tiempo más corto que la vacuna tradicional, lo cual podría ser beneficioso frente a un posible brote epidemiológico.

### 3- *Disminución de la cantidad de antígeno.*

La vacuna virosomal hacia el virus de la gripe Inflexal V<sup>®</sup> en presencia del ODN 504 en ratas Sprague-Dawley permitió diluir la vacuna 5 veces y generar el mismo nivel de anticuerpos específicos de clase IgG con respecto a la vacuna sin diluir.

Una dosis conteniendo aproximadamente 78 veces menos cantidad de antígeno de la vacuna Inflexal<sup>®</sup> en presencia del ODN 504 fue capaz de producir una gran variabilidad de anticuerpos anti Hemaglutinina, ampliando de esta manera el espectro y reconocimiento de otras cepas virales relacionadas o no antigénicamente a las cepas incluidas en la vacuna utilizada para inmunizar a los animales.

La administración conjunta del ODN 504 con la formulación de la vacuna hacia el virus de la Hepatitis A HAVRIX<sup>®</sup> (la cual contiene alúmina), no demostró el efecto del oligonucleótido en ratas Sprague-Dawley. Nosotros pensamos que la concentración de alúmina en las dosis vacunales en presencia del ODN 504 juega un rol fundamental para reflejar el efecto del mismo. Por otro lado, cuando se utilizó la vacuna comercial Virohep-A<sup>®</sup> la cual no contiene alúmina como adyuvante y en reemplazo de éste posee Hemaglutinina del virus de Influenza, solo en altas dosis de antígeno el porcentaje de reactividad, es decir presencia de anticuerpos IgG-anti VHA, en ausencia o en presencia del ODN 504, fue similar. Sin embargo, cuando se realizó una dilución 1/10 del antígeno los sueros que presentaron reactividad fueron los provenientes de los animales inmunizados en presencia del ODN 504. Lo obtenido en Hepatitis A es

promisorio, debido a que hasta el momento solo se reportaron resultados favorables cuando se utilizó la combinación de dos o más adyuvantes simultáneamente. Por ejemplo en un ensayo en aves, se observó un aumento de anticuerpos específicos anti-VHA cuando se utilizó el ODN CpG 2006 en combinación con el adyuvante de Freund Incompleto y alúmina (231). En ratones de la cepa Balb/c, también se observó un aumento en la respuesta del título de anticuerpos (específicos anti VHA) en el GALT (de sus siglas en inglés gut-associated lymphoid tissue/tejido linfoide asociado al intestino), luego de co-administrar el ODN CpG 1826 junto a un sistema de entrega de antígeno poli-catiónico por vía intranasal o intrarectal (232).

Cuando se utilizó la vacuna antirrábica VeroRab<sup>®</sup> (Sanofi Pasteur), la acción del ODN 504 permitió diluir la vacuna 25 veces y aún así proporcionar un 100% de protección luego del desafío con 100 DL50 en ratas Sprague-Dawley (97). Con un diseño experimental similar al utilizado por nosotros, Wang y colaboradores (233) obtuvieron en ratones Balb/c desafiados con 50 DL50, un 100% de protección utilizando una dilución 1/5 de la vacuna de virus de la rabia inactivado (VRI) junto a un oligonucleótido con motivos CpG. Un dato interesante de destacar en este trabajo fué, que con el objetivo de utilizar el ODN CpG en humanos, fueron testeados una serie de oligonucleótidos en células mononucleares de sangre periférica humana. Dentro de los grupos de oligonucleótidos CpG utilizados, incluyeron como control un ODN invirtiendo el par CG. La actividad presentada por este ODN no CpG fue aproximadamente 2.5 veces menor con respecto al ODN CpG, y 5 veces mayor con respecto al control negativo. Sin embargo, los autores consideraron que el ODN no CpG no presentó actividad en la estimulación de la proliferación celular.

Con el objetivo de disminuir la cantidad de antígeno utilizado, Sanofi Pasteur realizó una prueba clínica utilizando 1/3 (33.3%) de la vacuna comercial por vía intradérmica (administrada en un solo sitio del cuerpo), a diferencia de la vía intramuscular utilizada actualmente. Luego de tres dosis todos los individuos seroconvirtieron, sin embargo en ninguno de los casos se obtuvieron valores superiores a 10 UI/mL (234), a pesar de utilizar una vía de inmunización más inmunogénica. Nuestros resultados de la prueba piloto en humanos, utilizando una dilución al 1/5 (20%) de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en presencia del ODN 504, fueron mejores que los obtenidos por la prueba de Sanofi Pasteur, debido a que luego de la tercera dosis 4/5 individuos presentaron en promedio 30UI/mL de anticuerpos protectivos. Similares valores a los descriptos por nosotros, fueron reportados por Warrell y colaboradores (235). En este estudio se utilizó la dosis completa de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> por vía intradérmica en cuatro sitios diferentes del cuerpo de los individuos. Según los valores predictivos de Strady y colaboradores. (236), individuos que

presentan valores  $\geq 30$ UI/mL son considerados “buenos respondedores” y deberían recibir un refuerzo cada 10 años.

En noviembre del año 2014 el ODN 504 fue incluido por la FDA en el listado de Designación de Drogas o Medicamentos Huérfanos (Food and Drug Administration Orphan Drug Designation) para el tratamiento de infecciones por el virus de la rabia, (<http://www.orphan-drugs.org/2014/12/09/fda-orphan-drug-designation-november-2014/>).

#### **4- *Aumento de la diversidad de Respuesta***

El estudio cualitativo (mediante un ensayo de reactividad cruzada) de los anticuerpos generados en los animales que recibieron la vacuna Inflexal V<sup>®</sup> y el ODN 504, evidenció el reconocimiento de un mayor número de péptidos de la Hemaglutinina (HA) hacia cepas incluidas en la vacuna y relacionadas o no a éstas. Estos resultados indican la generación de anticuerpos específicos a diferentes zonas de la Hemaglutinina (reactividad cruzada), tanto en las regiones HA1 como HA2. Debido a que la región más conservada de la HA la contiene el péptido HA2 (237) los anticuerpos generados hacia esta región adquieren un potencial poder protector (238, 239, 240), y ha sido postulada como posible candidata para una vacuna de la gripe universal (237, 241).

Cuando se evaluaron anticuerpos neutralizantes mediante el ensayo de inhibición de la hemaglutinación (IHA), se obtuvieron resultados concordantes a los obtenidos con el ensayo de reactividad cruzada. Estos resultados fueron reflejados independientemente de la formulación de la vacuna comercial ya sea virosomal (Inflexal<sup>®</sup>) o virus inactivado (Fluarix<sup>®</sup>). Por lo tanto, la acción inmunoestimulante del oligonucleótido aumentó la diversidad de anticuerpos neutralizantes y la generación de los mismos no se encuentra limitada a la naturaleza del antígeno del virus de la gripe de las vacunas comerciales.

La alta patogenicidad del virus de la gripe aviar H5N1 reportado por primera vez en China en 1996, causante de graves epidemias (159, 160), nos motivó a evaluar la reactividad cruzada del ODN 504 hacia la cepa H5N1 A/Vietnam/1203/2004. El porcentaje de péptidos revelados en presencia del ODN 504 fue aproximadamente un 13% mayor con respecto a la vacuna sola (la cual no contenía esta cepa). Un incremento en el repertorio de anticuerpos también fue reportado por Khurana y colaboradores utilizando el adyuvante MF59 junto a la vacuna H5N1A/Vietnam/1203/2004, luego de administrar la segunda dosis en humanos adultos (242).

Cooper, quien dirigió varias pruebas clínicas utilizando el ODN CpG 7909 (2006) junto a vacunas de Hepatitis B, testeó este oligonucleótido junto a una dilución 1/10 de la vacuna Fluarix<sup>®</sup> (fase Ib) (243). En este estudio no se observó un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes (determinados por IHA), mientras que se reportó un incremento en la producción de IFN- $\gamma$  en células mononucleares de sangre periférica luego de la estimulación con los antígenos de las cepas incluidas en la vacuna. En este estudio no se incluyó la cuantificación de la reactividad cruzada a otras cepas.

En ratas ancianas inmunizadas con la vacuna Inflexal<sup>®</sup> también se observó, al igual que en los animales adultos jóvenes, un reconocimiento de los anticuerpos generados en presencia del ODN 504 a cepas no relacionadas antigénicamente a la cepa A/H3N2 incluida en la vacuna. El haber encontrado reactividad únicamente con la cepa no relacionada, y no así con la cepa relacionada antigénicamente a la cepa incluida en la vacuna A/H3 N2, nos hace suponer que este resultado se debe principalmente a una dificultad técnica/analítica presentada con el antígeno durante el ensayo. El hecho de que la reactividad del suero control o de referencia de la cepa relacionada fue bajo con respecto a los valores históricos observados para esta cepa, sostiene la idea de que la estructura del antígeno probablemente se alteró.

##### **5- *Incremento de la respuesta en inmunocomprometidos***

El aumento en el título de anticuerpos de clase IgG observado en ratas ancianas junto a la vacuna Inflexal<sup>®</sup> en presencia del ODN 504, también se reflejó en un significativo incremento en el título de anticuerpos neutralizantes determinados por IHA únicamente hacia la cepa vacunal A/H3N2 Moscow A/M/10/99. Así mismo, en un estudio clínico realizado en individuos de avanzada edad (mayor a 65 años) utilizando el adyuvante MF-59, también se evidenció un aumento en la inmunogenicidad solo hacia la cepa vacunal H3N2 (244).

En las últimas décadas, el subtipo A/H3N2 reflejó la mayor cantidad de cambios de nucleótidos en la región codificante de la Hemaglutinina, los cuales se asociaron a un aumento de la morbilidad en ancianos, por lo que en muchos trabajos solo se evaluó la respuesta de anticuerpos neutralizantes hacia variantes de este subtipo (245). En este contexto, nuestros resultados son alentadores.

## 6- *Mantenimiento de las células B de memoria*

Continuando con los requerimientos de la actividad de un adyuvante, es lógico pensar que luego de una infección primaria, el sistema inmunológico debe estar preparado para entrar en acción en el caso de que ocurra una infección secundaria. Si bien la inmunidad innata proporciona una rápida respuesta a los patógenos, la respuesta inmune adaptativa al ser específica, proporciona inmunidad esterilizante y memoria a largo plazo.

En este sentido, las células B de memoria juegan un rol fundamental en el mecanismo de defensa de las infecciones secundarias permaneciendo durante toda la vida del individuo, inclusive si solo se expuso al antígeno una sola vez (246, 247). Estas células sobreviven en los órganos linfoides secundarios (248), y el mantenimiento de estas poblaciones celulares sigue siendo objeto de estudio (249, 250).

La teoría de la persistencia del antígeno para mantener las células B de memoria es cuestionable, debido a que si la presencia del antígeno es el único mecanismo disponible para mantener la producción de anticuerpos, la memoria inmunológica estaría limitada solo a los antígenos que se encuentren presentes en el individuo. Por lo tanto, se buscaron mecanismos alternativos que podrían garantizar la continua proliferación y diferenciación de las células de memoria B, independientemente de la persistencia del antígeno.

En concordancia con lo anterior, Lanzavechia (164) demostró que la memoria serológica a “largo plazo”, se podría deber en parte a estímulos policlonales provenientes de moléculas PAMP’S’s por ejemplo Lipolisacárido (LPS) o ADN simple cadena con motivos CpG, los cuales activan la proliferación y diferenciación de las células B de memoria (CD27<sup>+</sup>) en ausencia de antígeno.

La actividad del ODN 504 en las células B de memoria se realizó en un modelo experimental de ratas Sprague-Dawley. Los resultados fueron concluyentes, la administración del ODN 504 en ausencia del antígeno aumentó significativamente el número de células formadoras de anticuerpos de clase IgG anti el antígeno recombinante de Hepatitis B (HBsAg) en médula ósea. Este resultado indica que las células B de memoria pueden proliferar en presencia de un oligonucleótido que suponemos simula una molécula DAMP.

Una vez estimuladas las células B de memoria, además de proliferar, producen *in vivo* niveles bajos de anticuerpos de manera de mantener un nivel constante de los mismos en los individuos a lo largo de su vida (164). En función de lo expuesto, determinamos los niveles de anticuerpos hacia el antígeno recombinante de Hepatitis B en el suero de los individuos que habían recibido una fracción al quinto de la

vacuna VeroRab<sup>®</sup> en ausencia y en presencia de 1mg de ODN 504 (prueba piloto). Decidimos evaluar los anticuerpos anti HBsAg debido a que todos los individuos habían completado el esquema convencional de vacunación de Hepatitis B en algún momento de sus vidas. Los resultados fueron cualitativamente satisfactorios, ya que cinco de seis individuos que recibieron la vacuna VeroRab<sup>®</sup> en presencia del ODN 504, reflejaron un leve aumento de anticuerpos específicos anti HBsAg. Cabe mencionar que el individuo en el que no se observó un aumento de anticuerpos circulantes anti HBsAg, también presentó niveles bajos de anticuerpos protectivos anti el virus rábico, en comparación con los individuos del mismo grupo experimental.

Según la teoría de Lanzavechia la sensibilidad de las células B de memoria de responder a estímulos policlonales PAMP's, representa una característica fundamental de estas células. Nuestros resultados demuestran que, el ODN 504 estimula la proliferación y aumenta los niveles de anticuerpos de las células B de memoria, de manera de mantener inmunológicamente activa a esta población celular.

Un punto importante a destacar, es que la actividad *in vitro* del ODN 504 en monos y ratas fue menor comparada con la obtenida en humanos. Por lo tanto, podemos considerar a estas especies como un modelo “conservador” de la actividad inmunoestimulante del ODN 504, dado que el efecto adyuvante en ratas, se evidenció a altas diluciones de la vacuna VeroRab<sup>®</sup> a diferencia de lo observado en humanos.

Tomando en conjunto todos los resultados, podemos concluir que el ODN 504 posee la capacidad de generar una respuesta inmune efectiva con una inflamación controlada.

En la introducción describimos brevemente las funciones del sistema inmune y mencionamos la importancia de los mecanismos para mantener la homeostasis en el individuo, la cual pudo ser alterada por daño o infección. En consecuencia, es lógico pensar que el sistema inmune reconozca moléculas producidas durante la ruptura de la homeostasis y las utilice de manera tal que se generen o desencadenen una serie de eventos que restauren la misma.

Una observación importante de destacar vinculada con el concepto anterior, fue que durante el transcurso de los diferentes ensayos realizados en animales, ya sea en monos o ratas, registramos la disminución en la dispersión de la respuesta en los grupos que recibieron el oligonucleótido. Además, en presencia del ODN 504 no se observaron en tiempos tempranos respuestas exacerbadas hacia el antígeno de HBsAg en monos *Cebus apella*. Estas observaciones nos condujeron a pensar en una actividad inmunomoduladora del ODN 504.



Una patología en la cual se puede observar un tipo de desregulación del sistema inmune es la sepsis, donde se establece una respuesta inmune de signos contrarios o bifásica (251), en la cual encontramos una primera respuesta inflamatoria intensa, seguida de una respuesta anti inflamatoria compensatoria que conduce a la anergia inmunológica.

Bajo la hipótesis de que el ODN 504 puede funcionar en ambas fases de la sepsis, resultó interesante evaluar la actividad del ODN 504 en sepsis inducida por la inoculación de bacterias *Escherichia coli*. La administración del ODN 504 no redujo el porcentaje de mortalidad en los animales. Además, en este modelo experimental la mortalidad se produjo dentro de las 24-48 h. de inocular las bacterias. La muerte temprana que ocurre en este modelo limita su utilidad como representativo de lo que ocurre en sepsis en humanos. Sin embargo, un hecho importante de destacar es que los animales que sobrevivieron y recibieron el ODN 504 presentaron un mejor estado clínico, fisiológico e inmunológico que se reflejó en varios parámetros analizados por ejemplo: disminución de los niveles de citoquinas (IL-6, IL-10 y GM-CSF), de dímero D y de polimorfonucleares. Así mismo, el porcentaje de células B activadas CD45R<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup> aumentó en forma significativa en los animales que recibieron el ODN 504, lo cual indicaría la capacidad de revertir el estado de anergia. La actividad inmunoreguladora del ODN 504 también se registró luego de 24 h. de inocular las bacterias, observándose una reducción de la necrosis e inflamación lobular del hígado, presentando por lo tanto una función hepatoprotectora.

Los resultados *in vitro* en células mononucleares de sangre periférica proveniente de individuos politraumatizados demostraron también la actividad del ODN 504 aumentando el porcentaje de células CD19<sup>+</sup>CD40<sup>+</sup>.

En este contexto, la actividad del oligonucleótido es prometedora debido a que la gran mayoría de las muertes ocurre durante el período inmunosupresor, que en general se inicia entre el segundo y tercer día de la sepsis y puede persistir por varias semanas (110, 252). Cabe destacar además, que en un estudio realizado en pacientes al año de sobrevivir a una sepsis severa, se reportaron distintos tipos de deterioro creciente, generalmente no reversibles, que afectan la expectativa y calidad de vida (253) como por ejemplo, daño renal, encefalopatías (pérdida de memoria y capacidad cognitiva). En este sentido, el tratamiento con el oligonucleótido podría evitar en el paciente el desarrollo de una sepsis grave y sus consecuencias negativas. Consideramos que estos resultados podrían ser clínicamente relevantes debido a que no es conveniente, en un cuadro de sepsis, utilizar un fármaco que inhiba completamente los mediadores proinflamatorios con el objetivo de reducir la etapa o fase inflamatoria, como ya ha sido reportado en pruebas clínicas (254).

En un estudio realizado en E.E.U.U por Chahin y colaboradores (255), se evaluó la actividad del ODN 504 en un modelo experimental de sepsis neutropénica inducida por ciclofosfamida, seguido de la infección con *Pseudomona aeruginosa* por vía oral, en ratas Sprague-Dawley. La evaluación de la actividad del ODN 504 se realizó en distintos tiempos de la infección bacteriana, de manera que se generaron dos modelos experimentales de tratamiento con el oligonucleótido. En el modelo de tratamiento “temprano” se administró 50µg del ODN 504 a partir del día 1, continuando los días 3 y 5, es decir los animales recibieron tres dosis en total. Con este esquema de tratamiento se observó un 100% de supervivencia, a diferencia del 25% presentado en los animales que recibieron el placebo. Cuando en forma “tardía” a partir del día 5 y hasta el día 10 en un esquema de múltiples dosis (cinco dosis), se administró la misma cantidad del oligonucleótido (50µg), la supervivencia obtenida fue del 93%, mientras que la administración de un menor número de dosis (tres) presentó un 75% de supervivencia. Cabe destacar que un 81% de supervivencia se observó, cuando se administraron cinco dosis conteniendo una menor cantidad de ODN 504 (25µg). En todos los casos las diferencias fueron significativas con respecto al grupo control.

Finalmente Chahin y colaboradores compararon la actividad de cefepima, un antibiótico del grupo de las cefalosporinas, combinado o no al ODN 504 en el modelo de tratamiento con múltiples dosis. El porcentaje de supervivencia del antibiótico solo o combinado con el ODN 504 fue superior al 90%, por lo tanto, no se evidenció ni antagonismo ni pérdida de la eficiencia de ninguno de los dos agentes. Por otro lado, los niveles de IL-6 en plasma fueron significativamente más bajos en los animales que recibieron el ODN 504.

En la actualidad, uno de los problemas más críticos es la generación de bacterias resistentes a múltiples antibióticos (256), aumentando de esta manera la población de pacientes que no responden al tratamiento con los mismos (257). Por lo tanto, los resultados obtenidos por Chahin y colaboradores son atractivos para la intervención terapéutica con el ODN 504 en pacientes susceptibles a infecciones con *Pseudomonas aeruginosa*, como por ejemplo, individuos con quemaduras graves en donde las opciones de tratamiento son limitadas y las tasas de morbilidad y mortalidad elevadas (258).

Los resultados observados indicaron que el ODN 504 actuó en un modelo experimental de sepsis donde claramente ocurrió una alteración de la homeostasis y puede actuar en las dos fases de la sepsis.

Es importante destacar que a pesar de la gran inversión en tiempo y dinero realizada en estudios básicos y clínicos es desconcertante el hecho de que no exista actualmente ningún medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento específico de la Sepsis. Recientemente, el Xygris (proteína C reactiva

recombinante) y el Eritoran (un inhibidor del TLR4) debieron ser retirados, debido a su falta de eficacia clínica, como medicamentos específicos para el tratamiento de la sepsis (259). Esto ha traído como consecuencia una enorme resistencia de las grandes compañías farmacéuticas a invertir en el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento de la Sepsis.

Como mencionamos anteriormente, lo observado en presencia del ODN 504 en cuanto a una marcada disminución en la dispersión de los datos, una ausencia de hiper respuesta temprana de anticuerpos en monos *Cebus apella* hacia la vacuna de Hepatitis B, y una recuperación de los parámetros clínicos y fisiológicos en los animales que sobrevivieron a la inoculación de bacterias, fueron en su conjunto los primeros datos indicadores de la actividad inmunomoduladora del ODN 504. El trabajo de Chain (255) en sepsis, fue concluyente para confirmar la actividad inmunomoduladora del ODN 504.

Conforme a esta nueva característica, diferentes grupos de trabajo evaluaron la actividad de este oligonucleótido en distintas patologías en las que claramente existe una alteración del microambiente inmunológico. A continuación, se expone una breve descripción de los modelos experimentales en los cuales se evaluó la actividad inmunomoduladora del ODN 504.

En la diabetes tipo I el páncreas no produce insulina debido a fenómenos inflamatorios crónicos que destruyen las células  $\beta$  del páncreas. Importantes esfuerzos son dirigidos hacia el desarrollo de tratamientos con inmunomoduladores, para mantener y restaurar la actividad de las células  $\beta$  del páncreas (260, 261). Lantos y col. (113) evaluaron el efecto del ODN 504 en un modelo de diabetes inducida por streptozotocina (SZT) en ratas Sprague-Dawley. Los resultados fueron concluyentes: el ODN 504 recuperó los niveles de glucosa en sangre y regeneró los islotes de células  $\beta$  en páncreas. También resulta interesante saber que recientemente, se observó este tipo de actividad en un modelo de ratón de la cepa Balb/c (114). Además, resultados preliminares en nuestro laboratorio indican que el ODN 504 inhibe la inflamación alérgica de las vías respiratorias también en ratones Balb/c. Si bien, como se mencionó previamente, los ODN's *PyNTTTTGT* no poseen un efecto inmunoestimulante o adyuvante en ratón, podemos inferir que el ODN 504 posee una actividad inmunomoduladora en esta especie.

El dolor neuropático es un fuerte dolor crónico provocado por una lesión o enfermedad del sistema somatosensorial (262). Villar y colaboradores (112) reportaron que la administración por vía sistémica del ODN 504 redujo el dolor neuropático inducido por presión o aplastamiento del nervio ciático en ratas Sprague-Dawley.

En los últimos años, numerosos estudios han identificado a las células madre mesenquimales (MSCs de sus siglas en inglés mesenchymal stem cells) como elementos esenciales en la resolución de

procesos inflamatorios y, debido a la capacidad de diferenciarse *in vitro* a diferentes líneas celulares, su uso se postuló como una fuente probable de aplicación en terapias de reparación de tejido (263). Una de las características fundamentales de las MSC es su capacidad de exhibir propiedades pro-inflamatorias o anti-inflamatorias dependiendo del medio ambiente inmunológico (264, 265). Durante una etapa temprana de infección microbiana o daño celular, las MSC adoptan un fenotipo pro-inflamatorio (MSC1) (266, 267), sin embargo cuando la concentración de mediadores pro-inflamatorios aumenta, por ejemplo de IL-6, IFN  $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , las células mesenquimales adoptan un fenotipo anti-inflamatorio (MSC2) (268, 269).

En función de las características inmunoestimulantes del ODN 504 se evaluó *in vivo* en ratas Sprague-Dawley la expansión de MSC mediante el conteo de unidades formadoras de colonias de fibroblastos (CFU-Fs). Los resultados demostraron una recuperación aproximadamente de tres veces más de CFU-Fs con respecto a los controles (animales que recibieron solución fisiológica). Esta actividad no fue observada cuando se utilizaron los ODN's CpG 2006 (clase B) o 2216 (clase A) (111). Por otro lado, bajo determinadas condiciones de cultivo (270, 271), se observó que el tratamiento *in vitro* con el ODN 504 preservó la capacidad de las MSC para diferenciarse en diferentes líneas celulares, por ejemplo se observó diferenciación osteogénica y adipogénica (111).

En función de estos resultados, se evaluó el potencial osteogénico del ODN 504 *in vivo* en ratas. Para ello, se realizó una pequeña lesión en la tibia de estos animales seguido de la inoculación del ODN 504. El análisis de las lesiones reflejó un aumento significativo en el porcentaje de hueso consolidado en los animales que recibieron el ODN 504 con respecto al grupo de animales que recibió solución fisiológica (111).

Otra de las enfermedades con relevancia médica es la osteoporosis. Usualmente, esta enfermedad ha sido considerada exclusivamente de origen endocrino, sin embargo en la actualidad es sabido que la inflamación prolongada juega un importante rol en el desarrollo de esta enfermedad (272, 273). En este sentido, teniendo en cuenta la actividad inmunoreguladora del ODN 504, en un modelo experimental de osteoporosis en ratas se evaluó la actividad de este oligonucleótido. Los resultados nuevamente fueron concluyentes, el tratamiento con el ODN 504 recuperó la estructura ósea dañada en estos animales (274).

Como mencionamos anteriormente, las células madres mesenquimales son consideradas esenciales en la resolución de procesos inflamatorios. En este sentido, el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos GM-CSF (de sus siglas en inglés Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor) es un importante factor del crecimiento hematopoyético, e induce la liberación y movilización de las células madres mesenquimales desde la médula ósea hacia sangre periférica (275). En un trabajo de

nuestro grupo (Rodríguez y colaboradores.) se publicó que el ODN 504 en colaboración con IL-2 y las células dendríticas plasmacitoides, estimula a las células CD56<sup>+</sup> (NK/NKT) a secretar GM-CSF, siendo esta propiedad inhibida por el agregado de IFN- $\alpha$  (179). Por otro lado, la secreción de GM-CSF puede inducir la generación de células supresoras derivadas del linaje mieloide (MDSC), esta vía inmunosupresora es inhibida por el IFN- $\alpha$  (263, 276,277).

La importancia biológica de la activación de células NK, se debe a que al igual que las células dendríticas, constituyen un puente entre la inmunidad innata y adquirida por ejemplo, en presencia de IL-2 las células T activan a las células NK a responder a una serie de estímulos durante la infección (278). A su vez estas células pueden estimular la inflamación mediante la secreción por ejemplo de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , sin embargo se ha reportado que también pueden limitar fenómenos inflamatorios (279, 280).

Las células NKT también comparten características de la inmunidad innata y adaptativa, y son capaces de regular la respuesta inmune a través de la liberación de citoquinas y/o activación de otros componentes del sistema immune (281). Además, las células NKT presentan un papel central en la tolerancia periférica y en la protección contra enfermedades autoinmunes, cáncer, infecciones parasitarias, micóticas y virales (282, 283). Estas características en su conjunto les confieren un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmune, respondiendo a una variedad de injurias tanto exógenas como endógenas. Por lo tanto, las células CD56<sup>+</sup> son un componente clave en la restauración de la homeostasis, la cual se puede haber dañado como consecuencia por ejemplo de una infección, reacción autoinmune, cáncer o trauma, es decir por diferentes condiciones patológicas.

Un concepto importante de destacar del trabajo de Rodríguez es que el ODN 504, no solamente no induce la secreción de IFN- $\alpha$ , sino que también es un inhibidor de la expresión del mismo, cuando es inducida por un ODN CpG de clase A (ODN 2216) de manera dosis dependiente. En el mismo trabajo, se reportó además una baja inhibición de IFN- $\alpha$  cuando se utilizó como inductor poly-I:C (de sus siglas en inglés polyinosinic:polycytidylic acid), aún empleando altas concentraciones del ODN 504. Esto da un indicio de que hay vías compartidas entre los dos motivos por parte del “motivo CpG” y el *PyNTTTTGT* (179).

Hasta aquí, tomando en conjunto las actividades descritas por el ODN 504, podemos afirmar que este oligonucleótido es un inmunorregulador de la homeostasis: demostró ser útil en diferentes patologías en donde se evidenció un desequilibrio del microambiente inmunológico y, dependiendo del “daño/peligro” establecido, promovió la activación o no, de las diferentes herramientas inmunológicas cuyas patologías están relacionadas con alteraciones (o desbalance) del sistema inmune. Por un lado, si se

produce el ingreso de un antígeno extraño, el ODN 504 potencia la respuesta inmune, es decir manifiesta su actividad como adyuvante. Por otro lado, frente a un escenario inicial de excesiva inflamación, seguido de anergia, como ocurre por ejemplo en un cuadro de sepsis, el ODN 504 es reconocido por el sistema inmune, disminuyendo la respuesta inflamatoria sin que se llegue a perder la capacidad de las células (que activan la respuesta inmune adquirida) de ser estimuladas y a su vez, normalizando el fenotipo inmunodeprimido a un fenotipo casi normal, con respecto a los marcadores de activación celular.

La siguiente pregunta planteada por nosotros fue: ¿De qué manera el ODN 504 ejerce su acción? ¿Qué mecanismos subyacen en la acción de esta molécula que posee actividades tan diversas?

Recientemente, analizamos los datos de un estudio llevado a cabo en nuestro laboratorio sobre la activación de la transcripción de unos 20.000 genes en linfocitos B tratados a las 2, 4 y 22 horas con el ODN 504 (microarrays). En líneas generales, pudimos identificar un patrón diferencial de genes que se activan a diferentes tiempos de incubación con el ODN 504. En principio, podemos mencionar 3 (tres) grupos de genes: a) los que se inducen exclusivamente a “tiempos tempranos (2 y 4 hs)”, b) los que se inducen a “tiempos tempranos” y “tardío (22hs)” y c) los que se inducen exclusivamente a un “tiempo tardío”. Dentro del primer grupo evidenciamos un conjunto de genes cuyos productos son mayoritariamente proteínas de secreción, por ejemplo: IL-6, IL-8, IL-10, quemoquinas (CCL3/4/7) y LTA (lymphotoxin alpha). En su conjunto, el patrón de genes que se activa exclusivamente a “tiempos tempranos” con el ODN 504 presenta (casi en su totalidad) un perfil pro-inflamatorio. Recientemente, identificamos cantidades significativas de IL-10 e IL-8 en el sobrenadante de cultivo de células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con el ODN 504 (comunicación personal).

La expresión de genes correspondientes a proteínas de superficie se evidenció tanto a tiempos tempranos como tardío. Podemos mencionar en este grupo a: CD80, CD86, CD40, TRAF-4 (TNF receptor associated factor 4), CXCR5/7, IL-2Ra (interleukin 2 receptor subunit alpha) e IL21R (Receptor for interleukin 21).

Cuando se analizó la expresión de los genes a un tiempo tardío, se identificó un marcado aumento en la transcripción de los ARN mensajeros correspondientes a proteínas que constituyen el proteosoma, indicando una mayor capacidad de los linfocitos activados para procesar antígenos proteicos, además de regular diversos procesos de transmisión de señales intracelulares. Con la misma metodología, se observó el incremento del ARNm correspondiente a la enzima Citocin-Deaminasa Inducida por Activación (AID). Esta enzima es fundamental para llevar a cabo el cambio (switch) de clases de las inmunoglobulinas (Ig) y la hipermutación somática que resultan en un aumento de la afinidad y la diversidad de los anticuerpos

(284). La enzima AID no se expresa en células B “naive”, ni en células B de memoria en reposo ni en células plasmáticas. Su expresión es activada por diversos estímulos y preferentemente se expresa en células B del centro germinal (284, 285). De acuerdo a lo antedicho, el aumento en el repertorio de los anticuerpos anti Hemaglutinina observado por la vacuna Inflexal<sup>®</sup> V adyuvada con el ODN 504 en ratas Sprague-Dawley, podría explicarse por el aumento en la expresión de esta enzima.

También se identificó a tiempo tardío, la expresión de genes que codifican para proteínas de secreción, como: TNSF4 (OX40 ligand), CCL17 (C-C motif chemokine ligand 17) y *Ebi3* (Epstein-Barr virus-induced). El producto de la expresión de *Ebi3* es una proteína que pertenece a la familia de citoquinas de IL-12 y puede dimerizar con p28 o p35 para generar IL-27 o IL-35 respectivamente, ambas citoquinas con función anti-inflamatoria (286, 287). En los últimos años la IL-35 (dímero *Ebi3*/ p35) ha sido identificada como una citoquina inducible anti-inflamatoria (288).

Recientemente se ha propuesto a la IL-35 como molécula asociada a la restauración de la homeostasis “HAMP” (del inglés: homeostasis-associated molecular pattern), actuando en un doble rol de iniciador, y efector de la respuesta anti-inflamatoria (289). Asimismo, se ha demostrado que la IL-35 inhibe la inflamación en varios modelos autoinmunes como por ejemplo, en la artritis inducida por colágeno (290), la demielización autoinmune en el sistema nervioso central (291), diabetes y sepsis (289). Tanto la IL-10 como la IL-35 desempeñan su rol suprimiendo la inflamación en diferentes estadíos y/o tejidos (288). Por otro lado, es sabido que la IL-10 limita la respuesta inmune durante la infección con el propósito de prevenir un daño en el hospedador (292).

Continuando con el análisis, dentro del grupo de genes que se expresan exclusivamente a un tiempo tardío, identificamos el gen PTGES2 que codifica para la enzima Ciclooxygenasa 2 (COX2) o Prostaglandina-endoperóxido sintetasa 2, la cual posee funciones regulatorias. La COX2 es una enzima cuya expresión es inducida por estímulos inflamatorios, y permite al organismo producir una variedad de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, entre ellas la prostaglandina E2 (PEG2) y la 15d-PGJ2 (15-deoxi- $\Delta$ 12, 14- PGJ2) (293). Recientemente, se ha caracterizado a la PEG2 como una molécula DAMP, la cual es liberada por células muertas con acción anti-inflamatoria (294). La prostaglandina 15d-PGJ2 inhibe la activación de los inflamomas NLRP1 y NLRP3 (295), siendo esta propiedad la responsable, entre otras, de la actividad anti-inflamatoria observada en diferentes modelos animales de enfermedades autoinmunes (296).

Haciendo referencia a la pregunta inicial, con el objetivo de dilucidar los mecanismos de acción del ODN 504, es necesario vincular los resultados de las diferentes poblaciones celulares en las cuales el ODN 504 posee actividad directa. Podemos citar en primer lugar a los linfocitos B que, como consecuencia o producto de esta activación directa, secretan IL-6, IgM, proliferan y aumentan la expresión de moléculas co-estimuladoras. Por otro lado, lo observado en el ensayo de microarreglos, el cual también se realizó en linfocitos B puros, reflejó un aumento significativo en la activación de una serie de genes, entre ellos, *Ebi3* y Ciclooxygenasa 2. La funcionalidad de estos genes nos conduce, sin lugar a dudas, a la probable formación de IL-35/IL-27 y de PEG2 o 15d-PGJ2 respectivamente, las cuales están estrechamente asociadas a la resolución de procesos inflamatorios. Por ejemplo, PEG2 modula la percepción del dolor neuropático (297, 298), y 15d-PGJ2 cumple un papel fundamental en la homeostasis de la glucosa y el desarrollo de adipocitos (299).

En los últimos años se ha descrito a células del linaje B con potencial para producir citoquinas anti-inflamatorias, es decir citoquinas inmunomoduladoras (300). Estas células se denominaron células B reguladoras y se definen por su capacidad de regular la respuesta inmune en enfermedades infecciosas y/o autoinmunes, a través de la producción de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 (301, 302).

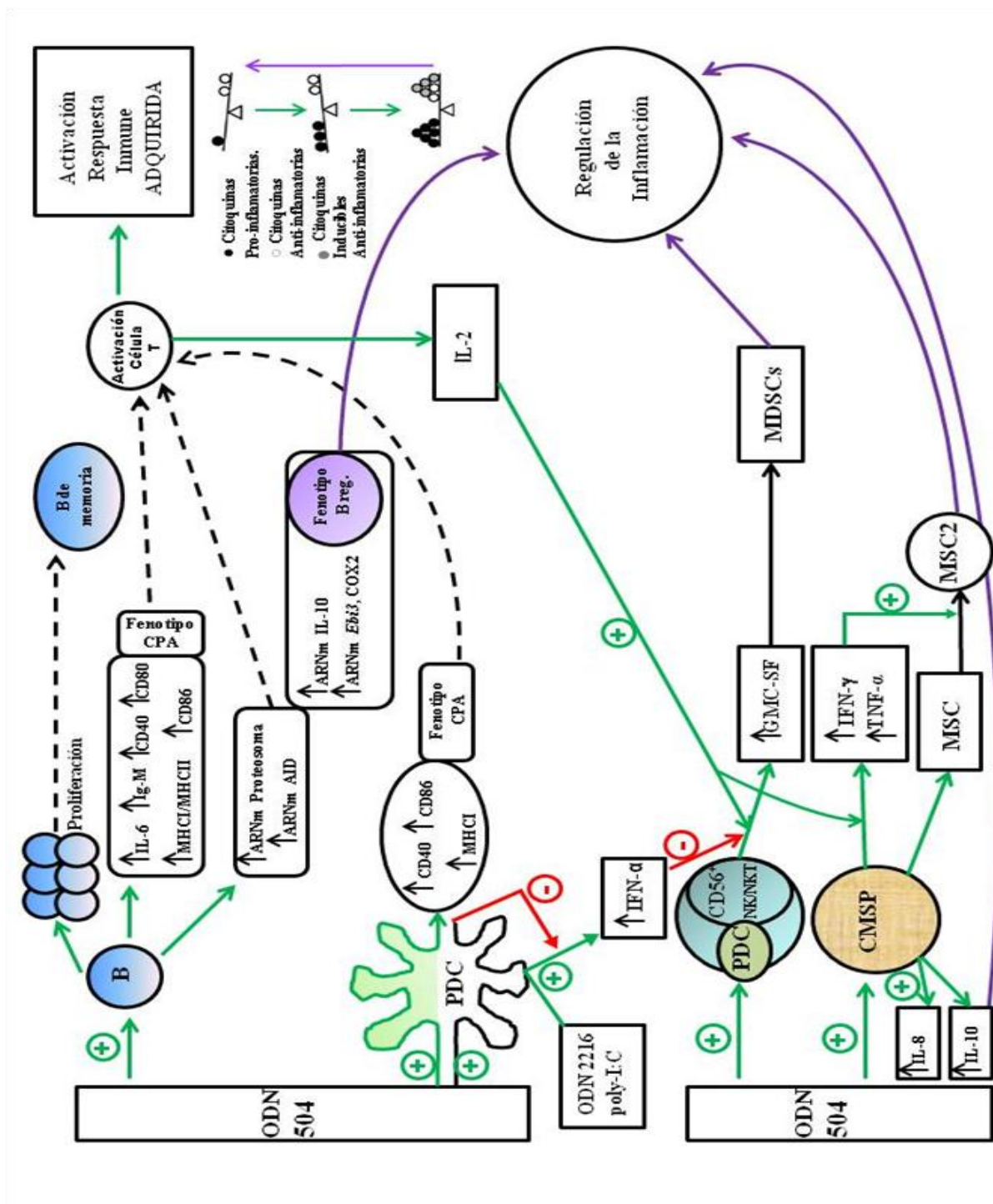
Nuestros resultados sugieren que el ODN 504 podría participar en la activación de células B reguladoras, las cuales pueden cumplir un rol protagónico fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmunomodulando la respuesta inmune.

Las células B reguladoras, activadas por el inmunomodulador ODN 504, constituirían una herramienta fundamental en la resolución de procesos inflamatorios y/o autoinmunes por varias vías, por ejemplo induciendo la síntesis de IL-35, PEG2/15d-PGJ2, y/o activando directa o indirectamente a otras poblaciones celulares como pueden ser las células madres mesenquimales. Futuros ensayos son necesarios para determinar la actividad del ODN 504 en células B reguladoras.

En la actualidad (febrero 2018), el oligonucleótido 504 se encuentra incluido en protocolos de ensayos clínicos para evaluar su actividad en dolor neuropático y sepsis. En este sentido, se han realizado ensayos de toxicidad en diferentes especies animales y se determinó el rango de dosis en la cual el ODN 504 puede ser utilizado con seguridad en ensayos clínicos (117).

La siguiente figura resume, en una representación esquemática, los efectos probables del ODN 504 en relación a la activación de la respuesta inmune y a la regulación de la inflamación.





ODN 504, ODN 2216. Linfocitos B (B). ↑ Aumento de la expresión de "X". Interleuquina (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10). Cluster de diferenciación (CD) ARN mensajero (ARNm). Complejo mayor de Histocompatibilidad Clase I/II (MHC I/MHC II). Deaminasa Inducida por Activación (AID). Células dendríticas plasmacitoides (pDC). Célula presentadora de antígeno (CPA). Célula B reguladora (Breg.). Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GMC-SF). Interferón alfa (IFN- $\alpha$ ). Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ). Enzima Ciclooxygenasa 2 (COX2). *Ebi3* (Epstein-Barr virus-induced gene 3). Células supresoras derivadas del linaje mieloides (MDSC). Células Madres Mesenquimales (MSC). Células Madres Mesenquimales fenotipo Anti-inflamatorio (MSC2). Células Natural Killer (NK). Células Natural Killer T (NKT). Células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Ácido polynosinic-polytidylic (poly-I:C).

Como se observa en la figura anterior, el ODN 504 activa diferentes poblaciones celulares estimulando la secreción de mediadores químicos que conducen a una activación de la respuesta inmune innata, seguido del establecimiento de la respuesta inmune adquirida. En este ambiente inflamatorio, se generan factores o citoquinas pro-inflamatorias los cuales, en función de la progresión de la respuesta inmune, aumentan su concentración, lo que induce a la expresión de citoquinas anti-inflamatorias. En este microambiente anti-inflamatorio las células B con fenotipo B regulador, activadas por el oligonucleótido 504, podrían jugar un rol fundamental contra arresando la respuesta inflamatoria, secretando IL-10 junto con otras moléculas, probablemente IL-35, PEG2 y 15d-PGJ2.

Hasta el momento no identificamos el receptor de esta familia de oligonucleótidos. Sin embargo, vinculando los resultados obtenidos por nosotros sumados a los reportados por Invivogen en el cual se testearon diferentes receptores del tipo Toll (TLR), no podemos concluir que el hTLR9 sea el receptor, por lo menos en forma exclusiva, de los ODN's *PyNTTTTGT* ni de los ODN CpG (más allá del ODN clase B 2006) en los modelos testeados.

Esta línea de investigación fue desarrollada por una integrante de nuestro laboratorio, en la cual generó un extenso trabajo que fue presentado como tesina de licenciatura el cual permitió ampliar las conclusiones anteriores. Bajo ciertas condiciones experimentales (de desnaturalización y doble estímulo de los ODN's), la conclusión más evidente fue que el hTLR9 es necesario, pero no suficiente, para la actividad de los ODN's CpG y del ODN 504. Por lo tanto, el modelo Hek293-hTLR tal cual se utiliza, no es válido para analizar la actividad de los oligonucleótidos.

Nosotros pensamos que estos resultados también modifican el paradigma publicado por Bauer (76) y sostenido por otros investigadores (77, 180, 181, 182, 183, 184, 185) en el cual se establece que el hTLR-9 es necesario y suficiente para transformar en respondedoras a células que no lo son frente al estímulo con los ODN CpG. Sin embargo, este trabajo no contradice nuestros resultados ya que en él únicamente se probó la actividad del ODN CpG 2006. Más aún, el oligonucleótido que utilizaron como control negativo fue el ODN 2006 con el par CpG invertido, y no les dió actividad en el sistema reportero NFκB/Luciferasa, en realidad este ODN es inmunoestimulante (ODN 21) como describimos en esta tesis. Klinman y colaboradores (180, 303, 304) llegaron a la misma conclusión que el grupo de Bauer con la diferencia que sumaron al estudio el ODN K3. La actividad de este ODN fue comparada con la del 2006 únicamente en un experimento en el que obtuvieron una actividad de NFκB aún mayor que con el ODN 2006. La actividad del ODN K3 mencionada por este grupo no pudo ser corroborada en nuestro laboratorio ya que al estimular a las HekTLR9 con este oligonucleótido no obtuvimos un aumento importante en los

niveles de la interleuquina IL-8. En nuestros experimentos no encontramos inconsistencias entre los resultados obtenidos midiendo IL-8 y actividad de NFκB, por lo tanto la diferencia en cuanto a la actividad del ODN K3 en el modelo Hek TLR9 no parecería deberse a diferencias en la forma de medir la actividad inmunoestimulante del oligonucleótido. Al año siguiente, el mismo grupo publicó otro trabajo (303) donde probaron la actividad en el modelo Hek de oligonucleótidos K (clase B) y D (clase A) concluyendo que, a diferencia de los primeros, los oligonucleótidos D no tuvieron actividad. Este trabajo difiere nuevamente con el nuestro en cuanto a la actividad del ODN K3. Sin embargo, no obtuvieron respuesta celular para los oligonucleótidos D, por lo tanto coincide con nuestros resultados en cuanto a que existen ODN's CpG que no tienen actividad en el modelo Hek.

Años más tarde, Arthur Krieg y col. publicaron un trabajo donde utilizaron ODN's de las tres clases de oligos CpG (A/B y C) en el sistema reportero ya mencionado (305). Estos autores consideraron que los tres tipos de oligonucleótidos estimularon la vía de señalización de NFκB dependiente de hTLR-9, aunque aclararon que se vieron diferencias significativas en las dosis respuestas entre las tres clases.

Tomando en conjunto todos los resultados probablemente sean necesarias, además del hTLR-9, otras moléculas involucradas en la internalización y/o localización adecuada de los oligonucleótidos y, al modelo Hek le falta alguna molécula o mecanismo esencial para la actividad de los *PyNTTTTGT* y los oligonucleótidos con motivos CpG, a excepción del ODN 2006.

Buscando cual sería el correlato natural de los oligonucleótidos *PyNTTTTGT*, se testeó la actividad de oligonucleótidos ARN (ácido ribonucleico cadena simple) en células mononucleares de sangre periférica, células B y pDC humanas. Para ello, los oligorribonucleótidos (ORN's) fueron incluidos en vesículas para facilitar el mecanismo de penetración a las diferentes células. Los resultados demostraron que los ORN's no fueron activos en ningún tipo celular evaluado (datos no mostrados).

Podría suceder que en condiciones naturales los ácidos nucleicos inmunoestimulantes pueden formar parte de estructuras supramoleculares con propiedades que no pueden representarse bien en nuestros experimentos *in vitro* (306, 307). Se ha descrito que durante los mecanismos de reparación del ADN se generan fragmentos de ADN simple cadena con propiedades inmunoestimulantes e inmunoregulatoras (308).

Por otro lado, el ODN 504 y el ODN CpG 2006 en sus versiones PO doble cadena no presentaron actividad inmunoestimulante, a pesar de respetar en el caso del 504 estrictamente el motivo *PyNTTTTGT*. Similares resultados fueron reportados por Zelenay (309) utilizando el ODN CpG 1826 PO doble cadena *in vitro* e *in vivo* en ratón.

Según la hipótesis de Krieg (60, 166) los oligonucleótidos con motivos CpG representan al ADN bacteriano y en consecuencia son considerados moléculas PAMP's, por lo tanto este resultado no estaría de acuerdo con la hipótesis de Krieg, ya que el ADN bacteriano se presenta como doble cadena, si bien podría suceder que el ADN bacteriano se desnaturalice en endosomas y se generen fragmentos de ADN simple cadena. En la misma línea, como mencionamos anteriormente Vollmer y Krieg, a pesar de diseñar oligonucleótidos invirtiendo el par CG o metilando la Citosina (del par CG) la capacidad inmunoestimulante no se perdió. Por lo tanto tomando en conjunto estos resultados, no podemos en forma estricta afirmar que los motivos CpG conteniendo Citosinas sin metilar pertenezcan al grupo de moléculas PAMP's, ya que el argumento para sostener esta hipótesis es que en mamíferos está metilada la Citosina y en esta condición no es inmunoestimulante.

Los límites para afirmar si una molécula pertenece al grupo PAMP o DAMP son muy difusos y necesitan a futuro ser estudiados y evaluados en profundidad y en su totalidad.

Nosotros suponemos que los ODN *PyNTTTTGT* simulan a una sub-familia de moléculas endógenas de ADN, es decir son moléculas DAMP's, las cuales se liberan durante una infección o daño y son reconocidas por el sistema inmune, el cual permanentemente está monitoreando el estado integral del mismo y acciona los mecanismos apropiados que posibilitan la restauración de la homeostasis.

El hecho de utilizar una molécula DAMP, ya sea en una vacuna, en un cuadro de sepsis, de diabetes, de dolor neuropático o en mecanismos de reparación, tiene una gran ventaja sobre el uso de moléculas exógenas, ya que por ser moléculas propias, estuvieron presentes durante el moldeado evolutivo del sistema inmune, proceso que llevó al desarrollo de los mecanismos de regulación de la homeostasis del sistema.

## *Bibliografía*

## Bibliografía.

1. Takeuchi, O., Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006; 126: 783-801.
2. Kawai, T. and S. Akira, The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat. Immunol.* 2010; 11 (5): 373-84.
3. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem. J.* 2009; 420 (1): 1-16.
4. Lemaitre, B., et al., The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*. 1996; 86 (6): 973-83.
5. Takeuchi, O. and S. Akira, Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010; 140 (6): 805-20.
6. Shaw M.H., Reimer T., Kim Y.G., Nunez G..Nod-like receptors (NLRs): Bona fide intracellularmicrobial sensors. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: 377–382.
7. Franchi L., Warner N., Viani K., Nunez G. Function of Nod-like receptors inmicrobial recognition and host defense. *Immunol. Rev.* 2009; 227: 106–128.
8. Franchi L., Eigenbrod T., Munoz-Planillo R., Nunez G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat. Immunol.* 2009; 10: 241–247.
9. Schroder K., Tschopp J. The inflammasomes. *Cell*. 2010; 140: 821–832.
10. Haitao Guo, Justin B. Callaway, Jenny P-Y Ting. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature. Medicine.* 2015; 21 (7).
11. J. Claire Hoving, Gillian J. Wilson and Gordon D. Brown. Signalling C-Type lectin receptors, microbial recognition and immunity. *Cellular Microbiology.* 2014; 16 (2): 185–194.
12. Kurt Buchman. Evolution of innate immunity: clues from invertebrates via fish to mammals. *Frontiers in Immunology*, September 2014, Volume 5, Article 459.
13. Dempsey P.W., Allison M.E., Akkaraju S., Goodnow C.C., Fearon D.T. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science.* 1996; 271: 348–350.
14. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol.* 2004; 40: 845–859.

15. Ioannis S. Pateras, Sophia Havaki, Xenia Nikitopoulou, Konstantinos, Vougas, Paul Townsend, Michalis I. Panayiotidis, Alexandros G. Georgakilas, Vassilis G. Gorgoulis. The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? *Nature decides when and where. Pharmacology and Therapeutics.* 2015; 154: 36-56.
16. F. M. Burnet. *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity* (Vanderbilt Univ. Press, Nashville, TN, 1959).
17. Lederberg J. Genes and antibodies. *Science.* 1959; 129: 1649-53.
18. Billingham R.E., Brent L., Medawar P.B. 'Actively acquired tolerance' of foreign cells. *Nature.* 1953; 172: 603-6.
19. Bretscher P., Cohn M. A theory of self-nonsel self discrimination. *Science.* 1970; 169: 1042-9.
20. Lafferty K.J., Cunningham A. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 1975; 53: 27-42.
21. Langman R.E., Cohn M. A short history of time and space in immune discrimination. *Scand. J. Immunol.* 1996; 44: 544-8.
22. Janeway C.A. Jr. Approaching the Asymptote? *Evolution and Revolution in Immunology.* Cold Spring Harbour Symposium Quant. Biol. 1989; 54: 1-13.
23. Janeway C.A. Jr. The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol. Today.* 1992; 13: 11-6.
24. Matzinger, P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 1994; 12: 991-1045.
25. Matzinger, P. An innate sense of danger. *Semin. Immunol.* 1998; 10: 399-415.
26. Matzinger, P. Essay 1: The Danger Model in Its Historical Context. *Scand. J. Immunol.* 2001; 54: 4-9.
27. Matzinger, P. The Danger Model: A Renewed Sense of Self. *Science*, April 2002; Vol 296: 12.
28. Matzinger, P. Friendly and dangerous signals: is the tissue in control? *Nat.Immunol.* 2007; 8: 11-13.
29. Matzinger, P. The evolution of the danger theory. *Expert Rev. Clin. Immunol.* 2012; 8: 311-317.
30. Matzinger, P. and Kamala, T. Tissue-based class control: the other side of tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* 2011; 11: 221-230.
31. Matzinger, P. and Fuchs E.J. Beyond 'self' and 'non-self': Immunity is a conversation not a war. *Journal of NIH Research.* 1996; 8: 35-39.

32. Gallucci, S., Lolkema M. and Matzinger P. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* 1999; 5: 1249-1255.
33. Stitaya Sirisinha. Insight into the mechanisms regulating immune homeostasis in health and disease. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2011; 29: 1-14.
34. S. Gallucci, P. Matzinger, *Curr. Opin. Immunol.* 2001; 13: 114.
35. Seong, S.Y. and Matzinger, P. Hydrophobicity: an ancient damage-associated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 2004; 4: 469–478.
36. K. Ishii et al., *J. Immunol.* 2001; 167: 2602.
37. Morita C.T., Tanaka Y., Bloom B.R., Brenner M.B. Direct presentation of non-peptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells. *Res. Immunol.* 1996; 147: 347-53.
38. Yasunobu Miyake, Eri Ishikawa, Tetsuaki Ishikawa and Sho Yamasaki. Self and nonself recognition through C-type lectin receptor, Mincle. *Self/Nonself Landes Bioscience.* 2010; 1 (4): 310-313.
39. Mark B. Richardson and Spencer J. Williams. MCL and MINCLE: C-type lectin receptors that sense damaged self and pathogen-associated molecular patterns *Frontiers in Immunology. Immunotherapies and Vaccines*, June 2014, Volume 5, Article 288.
40. Jules Hoffmann and Shizuo Akira. Innate immunity. *Current Opinion in Immunology.* 2013; 25: 1–3.
41. Grace Y. Chen and Gabriel Nuñez. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nature Reviews Immunology*, Volume 10, December 2010: 826-837.
42. Paul F. Hwang, Nancy Porterfield, Dylan Pannell, Thomas A. Davis and Eric A. Elster. Trauma is danger. *Reviews. Journal of Translational Medicine.* 2011; 9: 92.
43. Osterloh A., Kalinke U., Weiss S., Fleischer B. and Breloer M. Synergistic and differential modulation of immune responses by Hsp60 and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 4669-4680.
44. Taylor K.R., Yamasaki K., Radek K.A., Di Nardo A., Goodarzi H., Golenbock D., Beutler B. and Gallo R.L. Recognition of hyaluronan released in sterile injury involves a unique receptor complex dependent on Toll-like receptor 4, CD44, and MD-2. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 18265-18275.
45. Bianchi M.E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.* 2007; 81: 1-5.



46. Corinne Richard-Miceli and Lindsey A Criswell. Emerging patterns of genetic overlap across autoimmune disorders. *Genome Medicine*. 2012; 4: 6.
47. Rosas-Ballina M., et al. Acetylcholine-synthesizing T cells relay neural signals in a vagus nerve circuit. *Science*. 2011; 334 (6052): 98–101.
48. Coley, W.B. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas: with a report of ten original cases. *Am. J. Med. Sci.* 1893; 105: 487-511.
49. Wiemann, B. & Stames, C. O. Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective. *Pharmacol. Ther.* 1994; 64: 529-564.
50. Bast, R. C., Jr., and B. Simpson Bast. Critical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with non-specific immunostimulants. *Ann. NY Acad. Sci.* 1976; 277: 60.
51. Terry, W. D., and Y. Yamamura. *Immunobiology and Immunotherapy of Cancer: Developments in Immunology*. Elsevier/North-Holland, New York. 1979; Vol. 6.
52. Tokunaga, T., H. Yamamoto, S. Shimada, H. Abe, T. Fukuda, Y. Fujisawa, Y. Furutani, O. Yano, T. Kataoka, T. Sudo, N. Makiguchi, and T. Suganuma. Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J. Natl. Cancer Inst.* 1984; 72: 955.
53. Kuramoto, E., S. Toizumi, S. Shimada, and T. Tokunaga. In situ infiltration of natural killer-like cells induced by intradermal injection of the nucleic acid fraction from BCG. *Microbiol. Immunol.* 1989; 33: 929.
54. Tokunaga, T., O. Yano, E. Kuramoto, Y. Kimura, T. Yamamoto, T. Kataoka, and S. Yamamoto. Synthetic oligonucleotides with particular base sequences from the cDNA encoding proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induce interferons and activate natural killer cells. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36: 55.
55. Kuramoto, E., O. Yano, Y. Kimura, M. Baba, T. Makino, S. Yamamoto, T. Yamamoto, T. Kataoka, and T. Tokunaga. Oligonucleotide sequences required for natural killer cell activation. *Jpn. J. Cancer Res.* 1992; 83: 1128.
56. Yamamoto, S., T. Yamamoto, S. Shimada, E. Kuramoto, O. Yano, T. Kataoka, and T. Tokunaga. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiol. Immunol.* 1992; 36: 983.
57. Jon A. Wolff, Robert W. Malone, Phillip Williams, Wang Chong, Gyula Acsadi, Agnes Jani, Philip L. Felgner. Direct Gene Transfer into Mouse Muscle in Vivo. *Science*, March 1990, Vol 247: 1465-1468.
58. Jeffrey B. Ulmer, John J. Donnelly, Suezanne E. Parker, Gary H. Rhodes, Philip L. Felgner, V. J. Dwarki, Stanislaw H. Gromkowski, R. Randall Deck, Corille M. DeWitt, Arthur Friedman, Linda A. Hawe, Karen R. Leander, Douglas Martinez, Helen C. Perry, John W. Shiver, Donna L.

- Montgomery and Margaret A. Liu. Heterologous Protection Against Influenza by Injection of DNA Encoding a Viral Protein. *Science*, March 1993, New Series, Vol. 259, No. 5102: 1745-1749.
59. Bin Wang, Kenneth E. Ugent, Vasantha Srikantan, Michael G. Agadjanyant, Kesen Dang, Yoseff Refaeli, Alice I. Sato, Jean Boyer, William V. Williams, and David B. Weiner. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, May 1993, Vol. 90: 4156-4160.
  - 59b. Sato, Y., Roman, M., Tighe, H., Lee, D., Corr, M., Nguyen, M. D., Silverman, G. J., Lotz, M., Carson, D. A. and Raz, E., Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 1996. 273: 352–354.
  60. Arthur M. Krieg, Ae-Kyung Yi, Sara Matson, Thomas J. Waldschmidt, Gall A. Bishop, Rebeca Teasdale, Gary A. Koretzky and Dennis M. Klinman. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 6, April 1995, Vol. 374: 546-549.
  61. Julia Scheiermann and Dennis M. Klinman. Clinical evaluation of CpG oligonucleotides as adjuvants for vaccines targeting infectious diseases and cancer. *Vaccine*. 2014, November 12, 32 (48): 6377–6389.
  62. Rankin, R. et al. CpG motif identification for veterinary and laboratory species demonstrates that sequence recognition is highly conserved. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001; 11: 333–340.
  63. Yi, A. K., Chang, M., Peckham, D. W., Krieg, A. M. and Ashman, R. F. CpG oligodeoxyribonucleotides rescue mature spleen B cells from spontaneous apoptosis and promote cell cycle entry. *J. Immunol.* 1998; 160: 5898–5906.
  64. Hartmann, G. & Krieg, A. M. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J. Immunol.* 2000; 164: 944–953.
  65. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 9305–10.
  66. Hemmi, H. et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*. 2000; 408: 740–745.
  67. Juan M. Rodríguez, Fernanda Elias, Juan Fló, Ricardo A. López, Jorge Zorzopulos and Alejandro D. Montaner. Immunostimulatory PyNTTTTGT Oligodeoxynucleotides: Structural Properties and Refinement of the Active Motif. *Oligonucleotides*. 2006; 16: 275–285.
  68. Elias F, Fló J, Lopez RA, Zorzopulos J, Montaner A and Rodríguez JM. Strong CpG Independent Immunostimulation in Humans and other Primates by Synthetic Oligodeoxynucleotides with PyNTTTTGT Motifs. *Journal of Immunology*. 2003; 171: 3697-704.

69. Brewer, J. M. (How) do aluminium adjuvants work?. *Immunol. Lett.* 2006; 102: 10-15.
70. Lindblad, E. B. Aluminium adjuvants in retrospect and prospect. *Vaccine.* 2004; 22: 3658-3668.
71. Goto N., Kato H., Maeyama J., Shibano M., Saito T., Yamaguchi J., et al. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine.* 1997; 15:1364–71.
72. Gherardi R.K., Coquet M., Chérin P. Macrophagic myofasciitis: an emerging entity. *Lancet.* 1998; 352: 347–52.
73. Gherardi R.K., Coquet M., Cherin P., Belec L., Moretto P., Dreyfus P.A., et al. Macrophagic myofasciitis lesions assess long-term persistence of vaccine-derived aluminium hydroxide in muscle. *Brain.* 2001; 124: 1821–31.
74. Verdier F., Burnett R., Michelet-Habchi C., Moretto P., Fievet-Groyne F., Sauzeat E. Aluminium assay and evaluation of the local reaction at several time points after intramuscular administration of aluminium containing vaccines in the *Cynomolgus* monkey. *Vaccine.* 2005; 23: 1359–67.
75. Tomljenovic L., Shaw C. Mechanisms of aluminum adjuvant toxicity and autoimmunity in pediatric populations. *Lupus.* 2012; 21: 223–30.
76. Bauer, S., Kirschning, C. J., Hacker, H., Redecke, V., Hausmann, S., Akira, S., Wagner, H. and Lipford, G. B., Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 9237–9242.
77. Arthur M. Krieg. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nature Reviews Drug Discovery.* June 2006; Volume 5: 471-484.
78. Valmori D., Souleimanian N.E., Tosello V., et al. Vaccination with NY-ESO-1 protein and CpG in Montanide induces integrated antibody/Th1 responses and CD8 T cells through cross-priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007; 104: 8947–52.
79. Krieg A.M., Efler S.M., Wittpoth M., Al Adhami M.J., Davis H.L. Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CPG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist. *J. Immunother.* 2004; 27: 460–71.
80. Yang Y., Wu C., Morrow W. Cell death induced by vaccine adjuvants containing surfactants. *Vaccine.* 2004; 22: 1524–36.
81. Marrack P., McKee A., Munks M. Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium. *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9: 287–93.

82. Marichal T., Ohata K., Bedoret D., Mesnil C., Sabatel C., Kobiyama K., et al. DNA released from dying host cells mediates aluminum adjuvant activity. *Nat Med.* 2011; 17: 996–1002.
83. Eisenbarth S.C., Colegio O.R., O'Connor Jr W., Sutterwala F.S., Flavell R.A. Crucial role for the Nalp3 inflammasome in the immunostimulatory properties of aluminum adjuvants. *Nature.* 2008; 453: 1122–6.
84. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral. Hepat.* 2004; 11: 97–107.
85. Mc Cluskie M.J., Davis H.L. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J Immunol.* 1998; 161: 4463–6.
86. Freed D.C., Towne V.M., Casimiro D.R., Zhao Q., Fu T.M. Evaluating functional antibodies in rhesus monkeys immunized with hepatitis B virus surface antigen vaccine with novel adjuvant formulations. *Vaccine.* 2011; 29: 9385–90.
87. Halperin SA, Dobson S, McNeil S, 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: 20–6.
88. Halperin SA, Ward B, Cooper C, et al. Comparison of safety and immunogenicity of two doses of investigational hepatitis B virus surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide and three doses of a licensed hepatitis B vaccine in healthy adults 18–55 years of age. *Vaccine.* 2012; 30: 2556–63.
89. Garcon, N., P. Chomez, and M. M. Van. 2007. GlaxoSmithKline Adjuvant Systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev. Vaccines* 6: 723-739.
90. Reed, S.G., S. Bertholet, R.N. Coler, and M. Friede. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009; 30: 23-32.
91. Fernanda Elias, Juan Fló, Juan M. Rodríguez, Analía De Nichilo, Ricardo A. López, Jorge Zorzopulos, Carlos Nagle, Mónica Lahoz and Alejandro Montaner PyNTTTTGT prototype oligonucleotide IMT504 is a potent adjuvant for the recombinant Hepatitis B vaccine that enhances the Th1 response. *Vaccine* 23. 2005: 3597–3603.
92. Shan Lu. Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Curr Opin Immunol.* 2009 June; 21(3): 346–351.

93. N. Johnson, A. F. Cunningham and A. R. Fooks. The Immune Response to Rabies Virus Infection and Vaccination. *Vaccine*. 2010; Vol. 28, No. 23: 3896-3901.
94. M. J. Warrell and D. A. Warrel. Rabies and Other Lyssavirus Diseases. *Lancet*. 2004; Vol. 363, No. 9413: 959-969.
95. WHO Expert Consultation on Rabies. First report. Geneva: World Health Organization; 2004. (WHO Technical Report Series; 931).
96. Brown D., Featherstone J.J., Fooks A.R., Gettner S., Lloyd E., Schweiger M. Intradermal pre-exposure rabies vaccine elicits long lasting immunity. *Vaccine*. 2008; 26: 3909-12.
97. Alejandro D. Montaner, Analía De Nichilo, Juan M. Rodríguez, Andrés Hernando-Insúa, Juan Fló, Ricardo A. López, Verónica Sierra, Claudio Paolazzi, Oscar Larghi, David L. Horn, Jorge Zorzopulos, Fernanda Elias. IMT504: A New and Potent Adjuvant for Rabies Vaccines Permitting Significant Dose Sparing. *World Journal of Vaccines*. 2012; 2: 182-188.
98. Barker W.H.: Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970–1978. *Am. J. Public Health*. 1986; 76: 761–765.
99. Barker W.H., Mullooly J.P.: Pneumonia and influenza deaths during epidemics: Implications for prevention. *Arch. Intern. Med*. 1982; 142: 85–89.
100. Skea D.L., Barber B.H. Adhesion-mediated enhancement of the adjuvant activity of alum. *Vaccine*. 1993; 11: 1018–26.
101. Powers D.C., Smith G.E., Anderson E.L., Kennedy D.J., Hackett C.S., Wilkinson B.E., et al. Influenza A virus vaccines containing purified recombinant H3 hemagglutinin are well tolerated and induce protective immune responses in healthy adults. *J. Infect. Dis*. 1995; 171: 1595–9.
102. Davenport F.M. Seventeen years' experience with mineral oil adjuvant influenza virus vaccines. *Ann. Allergy*. 1968; 26: 288–92.
103. Moldoveanu Z., Love-Homan L., Huang W.Q., Krieg A.M. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. *Vaccine*. 1998; 16: 1216–24.
104. Fang Y., Rowe T., Leon A.J., et al. Molecular characterization of in vivo adjuvant activity in ferrets vaccinated against influenza virus. *J. Virol*. 2010; 84: 8369–88.
105. Cooper C.L., Davis H.L., Morris M.L, et al. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine. *Vaccine*. 2004; 22: 3136–43.

106. Montaner AD, Denichilo A, Rodríguez JM, Fló J, López RA, Pontoriero A, Savy V, Baumeister E, Frank R, Zorzopulos J, Elías F. Addition of the immunostimulatory oligonucleotide IMT504 to a seasonal flu vaccine increases hemagglutinin antibody titers in young adult and elder rats, and expands the anti-hemagglutinin antibody repertoire. *Nucleic Acid Ther* 2011; 21: 265-274
107. Ward P.A. New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol. Med.* 2012; 4: 1234-1243.
108. Rice T.W., Wheeler A.P. Severe Sepsis. *Infect. Med.* 2003; 20: 184-93.
109. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Comunicado de prensa. 27 de Febrero de 2017. GINEBRA.  
(<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>).
110. Otto G.P., Sossdorf M., Claus R.A., Rödel J., Menge K., Reinhart K., Bauer M., Riedemann N.C. The late phase of sepsis is characterized by an increased microbiological burden and death rate. *Crit. Care.* 2011; 15: R183.
111. Andrés Hernando-Insúa, Alejandro D. Montaner, Juan M. Rodríguez, Fernanda Elias, Juan Fló, Ricardo A. López, Jorge Zorzopulos, Erica L. Hofer, Norma A. Chasseing. IMT504, the Prototype of the Immunostimulatory Oligonucleotides of the PyNTTTTGT Class, Increases the Number of Progenitors of Mesenchymal Stem Cells Both In Vitro and In Vivo: Potential Use in Tissue Repair Therapy. *Stem Cells.* 2007; 25: 1047–1054.
112. María Florencia Coronel, Andrés Hernando-Insúa, Juan Manuel Rodríguez, Fernanda Elias, Norma Alejandra Chasseing, Alejandro Daniel Montaner and Marcelo José Villar. Oligonucleotide IMT504 reduces neuropathic pain after peripheral nerve injury. *Neuroscience Letters* 444. 2008: 69–73.
113. M. S. Bianchi A. Hernando-Insúa N. A. Chasseing, J. M. Rodríguez, F. Elías, N. Lago, J. Zorzopulos, C. Libertun, A. D. Montaner and V. A. Lux-Lantos. Oligodeoxynucleotide IMT504 induces a marked recovery in a streptozotocin-induced model of diabetes in rats: correlation with an early increase in the expression of nestin and neurogenin 3 progenitor cell markers. *Diabetologia.* 2010; 53: 1184-1189.
114. Maria S. Bianchi, Stefania Bianchi, Andrés Hernando-Insua, Leandro M. Martinez, Nestor Lago, Carlos Libertun, Norma A. Chasseing, Alejandro D. Montaner and Victoria A. Lux-Lantos. Proposed mechanisms for oligonucleotide IMT504 induced diabetes reversion in a mouse model of immunodependent diabetes. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016; 311: 380–395.
115. Juan M. Rodríguez, Fernanda Elias, Alejandro Montaner, Juan Fló, Ricardo A. López, Jorge Zorzopulos, Raúl J. Franco, Silvina P. Lenial, Mariela López Salón, María L. Pirpignani, Jorge Solimano, Guy Garay, Dardo Riveros, José Fernández, Roberto Cacchione, Juan Dupont. Oligonucleotide IMT504 induces an immunogenic phenotype and apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Medicina (Buenos Aires)* 2006; 66: 9-16.

116. Abdullah Chahin, Steven M. Opal, Jorge Zorzopulos, David V. Jobes, Yazan Migdady, Michelle Yamamoto, Nicholas Parejo, John E. Palardy, David L. Horn. The Novel Immunotherapeutic Oligodeoxynucleotide IMT504 Protects Neutropenic Animals from Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia and Sepsis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. February 2015; Volume 59 Number 2: 1225-1229.
117. Raúl Franco, Juan M. Rodríguez, Fernanda Elias, Andrés Hernando-Insúa, Juan Fló, Ricardo López, Carlos Nagle, Néstor Lago, Jorge Zorzopulos, David L. Horn, and Alejandro D. Montaner. Non-Clinical Safety Studies of IMT504, a Unique Non-CpG Oligonucleotide. *Nucleic acid therapeutics*. 2014; Volume 24, Number 4: 267-282.
118. Centers for Disease Control and Prevention. Hepatitis B vaccination—United States, 1982–2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2002; 51: 549–63.
119. Centers for Disease Control and Prevention. Incidence of acute hepatitis B—United States, 1990–2002. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2 Jan 2004; 52 (51–52): 1252–4.
120. Kubba AK, Taylor P, Graneek B, Strobel S. Non-responders to hepatitis B vaccination: a review. *Commun. Dis. Public Health* 2003; 6(2): 106–12.
121. Saoudi A, Kuhn J, Huygen K, de Kozak Y, Velu T, Goldman M, et al. TH2 activated cells prevent experimental autoimmune uveoretinitis, a TH1-dependent autoimmune disease. *Eur. J. Immunol.* 1993; 23: 3096–103.
122. Gracie JA, Bradley JA. Interleukin-12 induces interferon-gamma-dependent switching of IgG alloantibody subclass. *Eur. J. Immunol.* 1996; 26: 1217–21.
123. Scott A. Halperin, Gary Van Nest, Bruce Smith, Simin Abtahi, Heather Whiley c, Joseph J. Eiden. A phase I study of the safety and immunogenicity of recombinant hepatitis B surface antigen co-administered with an immunostimulatory phosphorothioate oligonucleotide adjuvant. *Vaccine* 21. 2003: 2461–2467.
124. Cooper, C.L., Davis, H.L., Morris, M.L., Efler, S.M., Al Adhami, M., Krieg, A.M., Cameron, D.W., and Heathcote, J. 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: 693–701.
125. Mazin Barry and Curtis Cooper. Review of hepatitis B surface antigen-1018 ISS adjuvant-containing vaccine safety and efficacy. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2007; 7 (11): 1731-1737.
126. Isabel Leroux-Roels, Francois Roman, Sheron Forgusa, Cathy Maesa, Fien De Boevera, Mamadou Dramé , Paul Gillard , Robbert van der Most , Marcelle Van Mechelen , Emmanuel Hanonb , Geert Leroux-Roels. Priming with AS03A-adjuvanted H5N1 influenza vaccine improves the kinetics, magnitude and durability of the immune response after a heterologous

- booster vaccination: An open non-randomised extension of a double-blind randomized primary study. *Vaccine* 28. 2010: 849–857
127. Stanley M. Lemon, Jördis J. Ott, Pierre Van Damme, Daniel Shouval. Type A viral hepatitis: A summary and update on the molecular virology, epidemiology, pathogenesis and prevention. *Journal of Hepatology*. 2018; Vol. 68: 167-184.
  128. Kathryn H. Jacobsen, Steven T. Wiersma. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine* 28. 2010: 6653–6657.
  129. Zhilun Zhang, Xiangjun Zhu, Yuansheng Hu, Miao Liang, Jin Sun, Yufei Song, Qi Yang, Haiquan Ji, Gang Zeng, Lifei Song & Jiangting Chen. Five-year antibody persistence in children after one dose of inactivated or live attenuated hepatitis A vaccine. *Hum Vaccin Immunother*. 2017, Jun 3; 13(6): 1-6.
  130. Vizzotti C, Gonzales J, Rearte A, et. al. Single-dose universal hepatitis A immunization in Argentina: low viral circulation and high persistence of protective antibodies up to 4 years. *J. Pediatric Infect. Dis. Soc*. 2015; 4: 62-67.
  131. Van Damme P, Leorux-Roels G, Suryakiran P, Folschweiller N, Van Der Meeren O. Persistence of antibodies 20 years after vaccination with a combined hepatitis A and B vaccine. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2017: 1-9.
  132. Stuurman AL, Marano C, Bunge EM, De Moerlooze L, Shouval D. Impact of universal mass vaccination with monovalent inactive hepatitis A vaccines – A systematic review. *Hum. Vaccin. Immunother*. 2017; 13: 724-736.
  133. N. Johnson, A. F. Cunningham and A. R. Fooks, “The Immune Response to Rabies Virus Infection and Vaccination,” *Vaccine* 2010, Vol. 28, No. 23: 3896-3901.
  134. M. J. Warrell and D. A. Warrel, “Rabies and Other Lyssavirus Diseases,” *Lancet* 2004, Vol. 363, No. 9413: 959-969.
  135. WHO: the world health report, Geneva. World Health Organisation 1996; 57.
  136. WHO: the health situation in South-East Asia Region. New Delhi Regional office of SEAR 1994-7.
  137. Rupprecht CE, Gibbons RV. Prophylaxis against Rabies. *NEngl. J. Med*. 2004; 351 (25): 2626-35.
  138. G. S. Turner, “Immunoglobulin (IgG) and (IgM) Anti-body Responses to Rabies Vaccine,” *Journal of General Virology* 1978, Vol. 40: 595-604.



139. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end-points. *Am. J. Hyg.* 1938; 27(3): 493-7.
140. WHO (2004) World Health Organization Expert Consultation on rabies. WHO Technical Report Series 931 First Report Available from <http://www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/B1ED8443-0993-408C-BF09-D1D06A6E1B45/0/FINALTEXTWHOTechnicalReportSeries090605.pdf>
141. Glezen, W.P. Serious morbidity and mortality associated with influenza epidemics. *Epidemiol. Rev.* 1982; 4: 25-44.
142. Fiore, A.E., Shay, D.K., Haber, P., Iskander, J.K., Uyeki, T.M., Mootrey, G., Bresee, J.S., and Cos, N.J. Prevention and control of influenza. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm. Rev.* 2007; 56: 1-54.
143. Dolan, S., Nyquist, A.C., Ondrejka, D., Todd, J., Gershman, K., Alexander J. et. al. Preliminary assessment of the effectiveness of the 2003-2004 inactivated influenza vaccine Colorado, Denver. Centers for Disease Control Prevention. *Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 2003; 53: 8-11.
144. Vilma L., Savy, Elsa G., Baumeister, Andrea V., Pontoriero. Estudio antigénico de cepas de influenza A (H3N2) circulantes en la Argentina y su relación con las cepas vacunales. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 225-230.
145. Ian A. Wilson and Nancy J. Cox. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 1990; 8: 737-71.
146. Wilson, I. A., Skehel, J. J., Wiley, D. C.. Structure of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature* 1981; 289: 366-73.
147. Lerner, R. A.. Tapping the immunological repertoire to produce antibodies of predetermined specificity. *Nature* 1982; 299: 592-96.
148. Lerner, R. A. Antibodies of predetermined specificity in biology and medicine. *Adv. Immunol.* 1984; 36: 1-44.
149. Knight, V., Kosel, J. A. Influenza virus. In *Viral and Mycoplasma Infections of the Respiratory Tract*, ed. V. Knight. Philadelphia: Lea & Febiger. 1973: 87-123.
150. Rubing Chen and Edward C. Holmes. Avian Influenza Virus Exhibits Rapid Evolutionary Dynamics. *Molecular Biology and Evolution*, 1 December 2006; Volume 23, Issue 12: 2336–2341.
151. Percy Minaya, Wilfredo Clará, Rafael Chacón, Jorge Clara, Carlos Marin y Nivaldo Linares. Situación de la Influenza por A (H5N1) en el mundo y sus implicancias para la vigilancia y respuesta en Centroamérica. Universidad del Valle de Guatemala (UVG). Noviembre 2009. *Revista* 20.13-27.

152. Neumann G. et.al. H5N1 influenza viruses: outbreaks and biological properties. *Cell Res.* 2010 Jan; 20 (1): 51-61.
153. Alexander. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine.* 2007 Jul 26; 25 (30): 5637-44.
154. Hsieh YC. et.al. Influenza pandemics: past, present and future. *J. Formos. Med. Assis.* 2006 Jan; 105 (1): 1-6.
155. Tam J.S. Influenza A (H5N1) in Hong Kong: an overview-Vaccine. 2002 May 15; 20 Suppl 2: 77-81.
156. Taubenberg J.K, et.al. Pandemic influenza-including a risk assessment of H5N1. *Rev. Sci. Tech.* 2009 Apr; 28 (1): 187-202.
157. Melidou A., et.al. Influenza A (H5N1): an overview of the current situation. *Euro. Surveill.* 2009 Apr; 14 (20): 1-5.
158. Wentao Gao, Adam C. Soloff, Xiuhua Lu, Angela Montecalvo, Doan C. Nguyen, Yumi Matsuoka, Paul D. Robbins, David E. Swayne, Ruben O. Donis, Jacqueline M. Katz, Simon M. Barratt-Boyes, and Andrea Gambotto. Protection of Mice and Poultry from Lethal H5N1 Avian Influenza Virus through Adenovirus-Based Immunization. *Journal of Virology*, Feb. 2006; Vol. 80, No. 4: 1959–1964.
159. Barker WH: Excess pneumonia and influenza associated hospitalization during influenza epidemics in the United States, 1970–1978. *Am. J. Public Health* 1986; 76: 761–765.
160. Barker WH, Mullooly JP: Pneumonia and influenza deaths during epidemics: Implications for prevention. *Arch. Intern. Med.* 1982; 142: 85– 89.
161. Lui KJ, Kendal AP: Impact of influenza epidemics on mortality in the United States from October 1972 to May 1985. *Am. J. Public Health* 1987; 77: 712–716.
162. Kendal AP, Pereira MS, Skehel JJ. Hemagglutination inhibition. En: *Concepts and procedures for laboratory based influenza surveillance.* Centers for Disease Control y Organización Sanitaria Panamericana; 1982: B17-B35.
- 162b. Daniela Weiskopf, Birgit Weinberger and Beatrix Grubeck-Loebenstien. Review. The aging of the immune system. *Journal compilation 2009. European Society for Organ Transplantation* 22 (2009) 1041–1050.
- 162c. Miguel Talledo y Katty Zumaeta. Onfluenza virus and the new Influenza A/H1N1 pandemics. *Rev.peru.bio.*, Diciembre 2009; 16(2):227-238.

163. Mitsuo Maruyama, Kong-Peng Lam and Klaus Rajewsky. Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. *Nature*, 2000; 407 (5): 636-642.
164. Nadia L. Bernasconi, Elisabetta Traggiai, Antonio Lanzavecchia. Maintenance of Serological Memory by Polyclonal Activation of Human Memory B Cells. *Science*, December 2002; Vol. 298, 13: 2199-2201.
165. Poltorak A1, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, Dec 11, 1998; 282 (5396): 2085-8.
166. Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects *Annu. Rev. Immunol.* 2002; 20: 709-60. Epub 2001 Oct 4.
167. Benner R., Hijman W. and Haaijman J.J. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.* 1981; 46, 1.
168. Benner, R., van Oudenaren, A. and Koch, G. In: *Immunological Methods* (Lefkovits, I. and Pernis, B., eds.) II. Academic Press, New York. 1981.
169. Ruben Benedetti, Ernesto Massouh, Juan F16. The bone marrow as a site of antibody production after a mucosal immunization. *Immunology Letters* 1995. 48: 109-115.
170. Koch G., Osmond D.G., Julius M.H. and Benner R The mechanism of thymus-dependent antibody formation in bone marrow. *J. Immunol.* 1981; 126: 1447.
171. Benner, R.A., van Oudenaren and de Ruiter, H. *Cell. Immunol.* 1977; 34, 125.
172. Maria Mamani-Matsuda, Antonio Cosma, Sandra Weller, Ahmad Faili, Caroline Staib, Loïc Garçon, Olivier Hermine, Odile Beyne-Rauzy, Claire Fieschi, Jacques-Olivier Pers, Nina Arakelyan, Bruno Varet, Alain Sauvanet, Anne Berger, Francois Paye, Jean-Marie Andrieu, Marc Michel, Bertrand Godeau, Pierre Buffet, Claude-Agnes Reynaud, and Jean-Claude Weill. The human spleen is a major reservoir for long-lived vaccinia virus-specific memory B cells. *Blood*, 1 May 2008; Vol 111, No. 9: 4653-4659.
173. Viktor Y. Dombrovskiy, MD, MPH; Andrew A. Martin, MD; Jagadeeshan Sunderram, MD; Harold L. Paz, MD. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. *Crit. Care Med.* 2007; Vol. 35, No. 5: 1244-1250.
174. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al: ACCP/SCCM Consensus conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 1992; 20: 864-874.

175. Greg S Martin. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2012 June; 10 (6): 701–706.
176. Greg S. Martin, M.D., David M. Mannino, M.D., Stephanie Eaton, M.D., and Marc Moss, M.D. The Epidemiology of Sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348, 16: 1546-1554.
- 176b. Amisha V. Barochia; Xizhong Cui; David Vitberg; Anthony F. Suffredini, Naomi P. O’Grady, Steven M. Banks, Peter Minneci, Steven J. Kern, Robert L. Danner, Charles Natanson, Peter Q. Eichacker. Bundled care for septic shock: An analysis of clinical trials. *Crit Care Med* 2010 Vol. 38, No. 2.668-678
177. Hotchkiss R S, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. [www.thelancet.com/infection](http://www.thelancet.com/infection). March 2013; Vol 13.
178. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 1998; 101: 311–320.
179. Juan M. Rodriguez, José Marchicio, Mariela López, Andrea Ziblat, Fernanda Elias, Juan Fló, Ricardo A. López, David Horn, Jorge Zorzopulos, Alejandro D. Montaner. PyNTTTTGT and CpG Immunostimulatory Oligonucleotides: Effect on Granulocyte/Monocyte Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Secretion by Human CD56+ (NK and NKT) Cells. *PLoS One* 2015; 10: 1-20.
180. F. Takeshita, C. A. Leifer, I. Gursel, K. J. Ishii, S. Takeshita, M. Gursel, and D.M. Klinman. Cutting Edge: Role of Toll-Like Receptor 9 in CpG DNA-Induced Activation of Human Cells. *The Journal of Immunology.* 2001; 167: 3555–58.
181. Latz, E., et al.. TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 190–198
182. Chuang th. et al. Toll-like receptor 9 mediates CpG-DNA signaling. *J. Leukoc. Biol.* 2002; 71 (3): 538-44.
183. Rutz M. et al., Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpGDNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34 (9): 2541-50.
184. Krug A. S. Rothenfuser, V. Hornung, B. Jahrsdorfer, S. Blackwell, Z.K. Ballas, S.Endres, A.M. Krieg and G. Hartmann. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells. *Eur J Immunol*, 2001; 31(7): 2154-63.

185. Marshall JD. et al., Superior activity of the type C class of ISS in vitro and in vivo across multiple species. *DNA Cell Biol.* 2005; 24(2): 63-72.
186. Kline, J.N., Businga, T.R., Waldschmidt, T.J., Weinstock, J.V., and Krieg, A.M. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J. immunol.* 1998; 15: 2555–2559.
187. Magone, M.T., Chan, C.C., Beck, L., Whitcup, S.M., and Raz, E. Systemic or mucosal administration of immunostimulatory DNA inhibits early and late phases of murine allergic conjunctivitis. *Eur. J. Immunol.* 2000; 30: 1841-1850.
188. Wooldridge, J.E., Ballas, Z., Krieg, A.M., and Weiner, G.J. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides containing CpG motifs enhance the efficacy of monoclonal antibody therapy of lymphoma. *Blood.* 1997; 89: 2994-2998.
189. Carpentier, A.F., Chen, L., Maltoni, F., and Delattre, J.Y. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res.* 1999; 59: 5429–5432.
190. Arthur M. Krieg. Development of TLR9 agonists for cancer therapy. *J. Clin. Invest.* 2007; 117: 1184-1194.
191. Jorg Vollmer Andrea, Janosch Meike Laucht, Zuhair K. Ballas, Christian Schetter, and Arthur M. Krieg. Highly Immunostimulatory CpG-Free Oligodeoxynucleotides for Activation of Human Leukocytes. *Antisense & Nucleic Acid Drug Dev.* 2002; 12: 165–175.
192. Lenert, P., Stunz, L.L., Yi, A.K., Krieg, A.M., and Ashman, R.F. CpG stimulation of primary mouse B cells is blocked by inhibitory oligodeoxyribonucleotides at a site proximal to NF- $\kappa$ B activation. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2001; 11: 247–256.
193. Krieg, A.M., Wu, T., Weeratna, R., Efler, S.M., Love-Homan, L., Yang, L., Yi, A.K., Short, D., and Davis, H.L. Sequence motifs in adenoviral DNA block immune activation by stimulatory CpG motifs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998; 12: 631–636.
194. Pisetsky, D.S., and Reich, C.F. Influence of backbone chemistry on immune activation by synthetic oligonucleotides. *Biochem. Pharmacol.* 1999; 58: 1981–1988.
195. Kadowaki, N., Antonenko, S., and Liu, Y.J. Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c<sup>+</sup> type 2 dendritic cell precursors and CD11c<sup>+</sup> dendritic cells to produce type I IFN. *J. Immunol.* 2001; 166, 2291–2295.
196. Krug, A., Towarowski, A., Britsch, S., Rothenfusse, S., Hornung, V., Bals, R., Giese, T., Engelmann, H., Endres, S., Krieg, A.M., and Hartmann, G. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur. J. Immunol.* 2001; 31: 3026–3037.

197. Sparwasser, T., Koch, E.S., Vabulas, R.M., Heeg, K., Lipford, G.B., Ellwart, J.W., and Wagner, H. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 1998; 28: 2045–2054.
198. Lindblad, E. B. 2004. Aluminium adjuvants--in retrospect and prospect. *Vaccine* 22: 3658-3668.
199. Glenny, A. T., and C. G. Pope. The antigenic effect of intravenous injection of diphtheria toxin. *J. Pathol. Bacteriol.* 1925; 28: 273-278.
- 199b. Pierre Vandepapeliere, Yves Horsmans, Philippe Morisa, Marcelle Van Mechelena, Michel Janssens, Marguerite Koutsoukosa, Pascale Van Belle, Frederic Clementc, Emmanuel Hanon, Martine Wettendorff, Nathalie Garcon, Geert Leroux-Roels. Vaccine Adjuvant Systems containing monophosphoryl lipid A and QS21 induce strong and persistent humoral and T cell responses against hepatitis B surface antigen in healthy adult volunteers. *Vaccine* (2008) 26, 1375—1386.
200. Reed, S. G., S. Bertholet, R. N. Coler, and M. Friede. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol.* 2009; 30: 23-32.
201. De Francesco Laura. Dynavax trial halted. Nature Publishing Group. May 2008 volume 26, number 5, 484 ([www.nature.com/naturebiotechnology](http://www.nature.com/naturebiotechnology)).
202. Cooper CL, Davis HL, Angel JB, et al. CPG 7909 adjuvant improves hepatitis B virus vaccine seroprotection in antiretroviral-treated HIV-infected adults. *AIDS.* 2005; 19: 1473–9.
203. Cooper CL, Angel JB, Seguin I, Davis HL, Cameron DW. CPG 7909 adjuvant plus hepatitis B virus vaccination in HIV-infected adults achieves long-term seroprotection for up to 5 years. *Clin Infect Dis.* 2008; 46: 1310–4.
204. Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV. Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity* 2003; 36 (8): 463–72.
205. Conrad B. Potential mechanisms of interferon-alpha induced autoimmunity. *Autoimmunity* 2003; 36 (8): 519–23.
206. Yu-Lin Hsu, Mei-Yi Wang, Ling-Jun Ho and Jenn-Haung Lai. Dengue virus infection induces interferon-lambda1 to facilitate cell migration. *Scientific Reports.* 2016; 6: 24530.
207. Liang, H., Y. Nishioka, C. F. Reich, D. S. Pisetsky, and P. E. Lipsky. Activation of human B cells by phosphorothioate oligodeoxynucleotides. *J. Clin. Invest.* 1996; 98:1119.
208. Polina Perelman, Warren E. Johnson, Christian Roos, Hector N. Seuanes, Julie E. Horvath, Miguel A. M. Moreira, Bailey Kessing, Joan Pontius, Melody Roelke, Yves Rumpler, Maria

- Paula C. Schneider, Artur Silva, Stephen J. O'Brien, Jill Pecon-Slattery. A Molecular Phylogeny of Living Primates. *PLoS Genetics*. March 2011, Volume 7, Issue 3: e1001342.
209. Ying Liu, Xing Luo, Chunting Yang, Sanke Yu, Honglin Xu. Three CpG oligodeoxynucleotide classes differentially enhance antigen-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Vaccine*. 2011; 29 : 5778-5784.
  210. Centers for Disease Control DC. Viral Hepatitis – Hepatitis B FAQs for the Public – Is the Hepatitis B Series Effective? May 23, 2016.
  211. Hashem B, El-Serag. Epidemiology of Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2012 May; 142 (6): 1264–1273.
  212. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J Viral Hepat*. 2004; 11: 97–107.
  213. WHO. WHO Position paper on hepatitis A vaccines. *Wkly Epidemiol Rec* 2012, 87:15.
  214. Mabel L. Halliday, Lai-Yi Kang, Ting-Kui Zhou, Meng-Dong Hu, Qi-Chao Pan, Ting-Yuan Fu, Yu-Sheng Huang, and Shan-Lian Hu. An Epidemic of Hepatitis A Attributable to the Ingestion of Raw Clams in Shanghai, China. *The Journal of Infectious Diseases* 1991; 164: 852-9.
  215. Cuthbert JA. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.* 2001; 14: 38-58.
  216. Ciocca M. Clinical course and consequences of hepatitis A infection. *Vaccine* 2000; 18 (Suppl. 1): S71-4.
  217. Shayam C, Duggal AK, Kamble U, Agarwal AK. Post-exposure prophylaxis for rabies. *JACM* 2006; 7 (1): 39-46.
  218. Cabasso VJ, Dobkin MB, Roby RE, Hammar AH. Antibody response to a human diploid cell rabies vaccine. *Appl. Microbiol.* 1974; 27 (3): 553-61.
  219. Berlin BS, Goswick C. Rapidity of booster response to rabies vaccine produced in cell culture. *J. Infect. Dis.* 1984; 50 (5): 785.
  220. Berlin BS. Rabies vaccine adsorbed: neutralizing antibody titers after three-dose pre-exposure vaccination. *Am. J. Public Health* 1990; 80 (4): 476-8.
  221. Lin HX, Perrin P. Influence of aluminum adjuvant to experimental rabies vaccine. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 1999; 13 (2): 133-5.
  222. Giuseppe Del Giudice, Birgit Weinberger and Beatrix Grubeck-Loebenstien. Vaccines for the Elderly. *Gerontology* July 2014: 1-8.

223. United Nations: Profiles of Ageing. 2013. United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. [http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/dataset/urban/profiles Of Ageing2013.shtml](http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/dataset/urban/profiles%20Of%20Ageing2013.shtml) (accessed May 10, 2014).
224. Bai JY, Yang YT, Zhu R, et al. CpG oligodeoxynucleotides discriminately enhance binding capacity of human naive B cells to Hepatitis B virus epitopes. *Can. J. Microbiol.* 2012; 58: 752-9.
225. McCluskie MJ, Davis HL. CpG DNA is a potent enhancer of systemic and mucosal immune responses against hepatitis B surface antigen with intranasal administration to mice. *J. Immunol.* 1998; 161: 4463-6.
226. Cooper CL, Davis HL, Morris ML, 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: 693-701.
227. ACIP: Prevention and control of influenza. *MMWR Recomm. Rep.* 1997; 46 (RR-9):1-25.
228. Fiebach N, Beckett W: Prevention of respiratory infections in adults: Influenza and pneumococcal vaccines. *Arch. Intern. Med.* 1994; 154: 2545-2557.
229. Arden NH, Patriarca PA, Kendal AP: Experiences in the use and efficacy of inactivated influenza vaccine in nursing homes; in Kendal AP, Patriarca PA (eds): *Options for the Control of Influenza*. New York, Liss, 1986: 155-168.
230. Strassburg MA, Greenland S, Sorvillo FJ, Lieb LE, Habel LA: Influenza in the elderly: Report of an outbreak and a review of vaccine effectiveness reports. *Vaccine* 1986; 4: 38-44.
231. Vanessa Salete de Paula, Alexandre dos Santos da Silva , Gentil Arthur Lins Bentes Mendonc, de Vasconcelos, Ezio Tavares Iff, Maria Eduarda Monteiro Silva, Livia Abud Kappel, Paula Borba Cruz, Marcelo Alves Pinto. Applied biotechnology for production of immunoglobulin Y specific to hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods.* 2001; 171: 102-106.
232. Leslie Ann Mitchell, Aviva Joseph, Eli Kedar, Yechezkel Barenholz, Eitan Galun. Mucosal immunization against hepatitis A: Antibody responses are enhanced by co-administration of synthetic oligodeoxynucleotides and a novel cationic lipid. *Vaccine.* 2006; 24: 5300-5310.
233. Xueju Wang, Musheng Baoa, Min Wan, Hongfei Wei, Li Wang, Hongtao Yu, Xuesong Zhang, Yongli Yu, Liying Wang. A CpG oligodeoxynucleotide acts as a potent adjuvant for inactivated rabies virus vaccine. *Vaccine.* 2008; 26: 1893-1901.



234. David Brown, John J. Featherstone, Anthony R. Fooks, Sharmeen Gettner, Elizabeth Lloyd, Martin Schweiger. Intradermal pre-exposure rabies vaccine elicits long lasting immunity. *Vaccine*. 2008; 26: 3909–3912.
235. M. J. Warrell, A. Riddell, L.-M. Yu, J. Phipps, L. Diggle, H. Bourhy, J. J. Deeks, A. R. Fooks, L. Audry, S. M. Brookes, F.-X. Meslin, R. Moxon, A. J. Pollard and D. A. Warrell, “A Simplified 4-Site Economic Intradermal Post-Exposure Rabies Vaccine Regimen: A Randomised Controlled Comparison with Standard Methods,” *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2008; Vol. 2, No. 4: 1-9.
236. C. Strady, R. Jaussaud, I. Béguinot, M. Lienard and A. Strady, “Predictive Factors for the Neutralizing Antibody Response Following Pre-Exposure Rabies Immunization: Validation of a New Booster Dose Strategy,” *Vaccine*. 2000; Vol. 18, No. 24: 2661-2667.
237. Gerhard, W., Mozdzanowska, K., and Zharikova, D. Prospects for universal influenza virus vaccine. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12: 569–574.
238. Gocnik, M., Fislova, T., Sla Dkova, T., Mucha, V., Kostolansky, F. and Vareckova, A. Antibodies specific to the HA2 glycopolyptide of influenza a virus haemagglutinin with Fusion-Inhibition activity contribute to the protection of mice against lethal infection. *J. Gen. Virol.* 2007; 88: 951–955.
239. Prabhu, N., Prabakaran, M., Ho, H.T., Velumani, S., Qiang, J., Goutama, M., and Kwang, J. Monoclonal antibodies against the fusion peptide of hemagglutinin protect mice from lethal influenza a virus H5N1 infection. *J. Virol.* 2009; 83, 2553-2562.
240. Corti, D., Suguitan, A.L., JR., Pinna, D., Silacci, C., Fernandez-Rodriguez, B.M., Vanzetta, F., Santos, C., Luke, C.J., Torres-Velez, F.J., Temperton, N.J., Weiss, R.A., Sallusto, F., Subbarao, K., and Lanzavecchia, A. Neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J. Clin. Invest.* 2010; 120: 1663-1673.
241. Steel, J., Lowen, A.C., Wang, T., Yondola, M., Gao, Q., Haye, K., Garcia-Sastre, A., and Palese, P. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*. 2010; 1: 1-9.
242. Khurana, S., Chearwae, W., Castellino, F., Manischewitz, J., King, L.R., Honorkiewicz, A., Rock, M.T., Edwards, K.M., Del Giudice, G., Rappuoli, R., and Golding, H. Vaccines with MF59 adjuvant expand the antibody repertoire to target protective sites of pandemic avian H5N1 influenza virus. *Sci. Transl. Med.* 2010; 2 (15): 1-5.
243. C.L. Cooper , H.L. Davis , M.L. Morris , S.M. Efler, A.M. Krieg, Y. Li e, C. Laframboise, M.J. Al Adhami, Y. Khaliq, I. Seguin, D.W. Cameron. Safety and immunogenicity of CPG 7909 injection as an adjuvant to Fluarix influenza vaccine. *Vaccine*. 2004; 22: 3136-3143.

244. Angelika Banzhoff, Pantaleo Naccib and Audino Podda. A New MF59-Adjuvanted Influenza Vaccine Enhances the Immune Response in the Elderly with Chronic Diseases: Results from an Immunogenicity Meta-Analysis. *Gerontology* 2003; 49: 177-184.
245. Filippo Ansaldia, Sabrina Bacilieri, Paolo Durando, Laura Sticchi, Laura Valle, Emanuele Montomoli, Giancarlo Icardi, Roberto Gasparini, Pietro Crovari. Cross-protection by MF59TM-adjuvanted influenza vaccine: Neutralizing and haemagglutination-inhibiting antibody activity against A(H3N2) drifted influenza viruses. *Vaccine*. 2008; 26: 1525-1529.
246. R. A. Manz, A. Thiel, A. Radbruch. Lifetime of plasma cells in the bone marrow *Nature*. 1997; 388: 133-134.
247. M. K. Slifka, R. Antia, J. K. Whitmire, R. Ahmed, Humoral immunity due to long-lived plasma cells. *Immunity*. 1998; 8 (3): 363-72.
248. M. Maruyama, K. P. Lam, K. Rajewsky, Memory B-cell persistence is independent of persisting immunizing antigen. Maruyama M1, Lam KP, Rajewsky K. *Nature*. 2000; 407 (6804): 636-42.
249. R. Ahmed, D. Gray. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 1996; 272, 54-60.
250. R. M. Zinkernagel, On differences between immunity and immunological memory *Curr. Opin. Immunol*. 2002; 14 (4): 523-36.
251. Ward PA. New approaches to the study of sepsis. *EMBO Mol. Med*. 2012; 4: 1234-1243.
252. Vesna Degoricija, Mirella Sharma, Ante Legac<sup>1</sup>, Marina Gradišer<sup>2</sup>, Siniša Šefer, Željko Vučićević. Survival Analysis of 314 Episodes of Sepsis in Medical Intensive Care Unit in University Hospital: Impact of Intensive Care Unit Performance and Antimicrobial Therapy. *Croat. Med. J*. 2006; 47: 385-97.
253. L. Leibovici, Long-term consequences of severe infections. *Clin. Microbiol. Infect*. 2013; 19: 510-512.
254. Shubin NJ, Monaghan SF, Hefferman DS, Chung CS, Ayala A. B and T lymphocyte attenuator expression on CD4<sub>T</sub> cells associates with sepsis and subsequent infections in ICU patients. *Crit. Care*. 2013; 17: R276.
255. Abdullah Chahin, Steven M. Opal, Jorge Zorzopulos, David V. Jobes, Yazan Migdady, Michelle Yamamoto, Nicholas Parejo, John E. Palardy, David L. Horn. The Novel Immunotherapeutic Oligodeoxynucleotide IMT504 Protects Neutropenic Animals from Fatal *Pseudomonas aeruginosa* Bacteremia and Sepsis. February 2015, Volume 59, Number 2: 1225-1229.

256. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* 2013;13: 1057-1098.
257. Gea-Banacloche JC, Opal SM, Jorgensen J, Carcillo JA, Sepkowitz KA, Cordonnier C. Sepsis associated with immunosuppressive medications: an evidence-based review. *Crit. Care Med.* 2004; 32: S578-S590.
258. Høiby N. Recent advances in the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis. *BMC Med.* 2011; 9: 32.
259. Angus, DC. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? *JAMA.* 2011; 306: 2614-2615.
260. Nikoopour E, Schwartz JA, Singh B. Therapeutic benefits of regulating inflammation in autoimmunity. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2008; 7: 203-210.
261. Fallarino F, Volpi C, Zelante T et al. IDO mediates TLR9-driven protection from experimental autoimmune diabetes. *J. Immunol.* 2009; 183: 6303-6312.
262. Jensen TS, Baron R, Haanpää M, Kalso E, Loeser JD, Rice AS, Treede RD. A new definition of neuropathic pain. *Pain* 2011; 152: 2204-2205.
263. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell* 2013; 13: 392-402.
264. Keating A. Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 2012; 10: 709-716.
265. Prockop DJ, Oh JY. Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs): role as guardians of inflammation. *Mol. Ther.* 2012; 20: 14-20.
266. Ulivi V, Tasso R, Cancedda R, Descalzi F. Mesenchymal stem cell paracrine activity is modulated by platelet lysate: induction of an inflammatory response and secretion of factors maintaining macrophages in a proinflammatory phenotype. *Stem Cells Dev.* 2014; 23: 1858-1869.
267. Seebach E, Freischmidt H, Holschbach J, Fellenberg J, Richter W. Mesenchymal stroma cells trigger early attraction of M1 macrophages and endothelial cells into fibrin hydrogels, stimulating long bone healing without long-term engraftment. *Acta Biomater* 2014; 10: 4730-4741.
268. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an

- alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 2012; 29: 1614-1625.
269. Dayan V, Yannarelli G, Billia F, Filomeno P, Wang XH, Davies JE, Keating A. Mesenchymal stromal cells mediate a switch to alternatively activated monocytes/macrophages after acute myocardial infarction. *Basic Res. Cardiol.* 2011; 106: 1299-1310.
270. Sekiya I, Larson BL, Smith JR et al. Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: Conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality. *STEM CELLS* 2002; 20: 530-534.
271. Pittenger MF, Mackay AM, Bech SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999; 284: 143-147.
272. Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, Föger-Samwald U, Ellinger I. Immunology of Osteoporosis: A Mini-Review. *Gerontology* 2016; 62: 128-137.
273. Hardy R, Cooper MS. Bone loss in inflammatory disorders. *J Endocrinol* 2009; 201: 309-320.
274. Jorge Zorzopulos, Steven M Opal, Andrés Hernando-Insúa, Juan M Rodriguez, Fernanda Elías, Juan Fló, Ricardo A López, Norma A Chasseing, Victoria A Lux-Lantos, Maria F Coronel, Raul Franco, Alejandro D Montaner, David L Horn. Immunomodulatory oligonucleotide IMT504: Effects on mesenchymal stem cells as a first-in-class immunoprotective/immunoregenerative therapy. *World J Stem Cells* 2017 March 26; 9(3): 45-67.
275. Yufang Shi, Catherine H Liu, Arthur I Roberts, Jyoti Das, Guangwu Xu, Guangwen Ren, Yingyu Zhang, Liying Zhang, Zeng Rong Yuan, Hung Sheng William Tan, Gobardhan Das, Satish Devadas. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Research* (2006)16: 126-133.
276. Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* 2014; 6: 526-539.
277. Di Ianni M, Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 2008; 36: 309-318.
278. Horowitz A, Behrens RH, Okell L, Fooks A, Riley EM (2012) NK Cells as Effectors of Acquired Immune Responses: Effector CD4+ T Cell-Dependent Activation of NK Cells Following Vaccination. *J Immunol* 185: 2808–2818.
279. Flodström-Tullberg M, Bryceson YT, Shi FD, Höglund P, Ljunggren HG. Natural killer cells in human autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 634-640.

280. Jiang W, Chai NR, Maric D, Bielekova B. Unexpected role for granzyme K in CD56bright NK cell-mediated immunoregulation of multiple sclerosis. *J Immunol* 2011; 187: 781-790.
281. Marrero I, Ware R, Kumar V. Type II NKT Cells in Inflammation, Autoimmunity, Microbial Immunity, and Cancer. *Front Immunol* 2015; 6: 316.
282. Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, Roelofs H. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013; 31: 1980-1991.
283. Duffy MM, McNicholas BA, Monaghan DA, Hanley SA, McMahon JM, Pindjakova J, Alagesan S, Fearnhead HO, Griffin MD. Mesenchymal stem cells and a vitamin D receptor agonist additively suppress T helper 17 cells and the related inflammatory response in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 2014; 307: F1412-F1426.
284. Xu Z, Zan H, Pone EJ, Mai T, Casali P. Immunoglobulin class switching: induction, targeting and beyond. *Nature Rev Immunol.* 2012; 12: 517–531.
285. Hong Zan and Paolo Casali. Regulation of Aicda expression and AID activity. *Autoimmunity.* 2013 March; 46 (2): 83–101.
286. Devergne, O., Birkenbach, M. & Kieff, E. Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 12041-12046.
287. Niedbala, W. et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 3021-3029.
288. Xinyuan Li, Jietang Mai, Anthony Virtue, Ying Yin, Ren Gong, Xiaojin Sha, Stefanie Gutchigian, Andrew Frisch, Imani Hodge, Xiaohua Jiang, Hong Wang, Xiao-Feng Yang. IL-35 Is a Novel Responsive Anti-inflammatory Cytokine -A New System of Categorizing Anti-inflammatory Cytokines. *PLoS ONE.* March 2012; Volume 7. Issue 3: 1-13.
289. Xinyuan Li, Pu Fang, William Y. Yang, Hong Wang, Xiaofeng Yang. IL-35, as a newly proposed homeostasis-associated molecular pattern, plays three major functions including anti-inflammatory initiator, effector, and blocker in cardiovascular diseases. *Citokyne Elsevier Ltd.* June 2017; 03-006.1-6.
290. Niedbala W, Wei XQ, Cai B, Hueber AJ, Leung BP, et al. IL-35 is a novel cytokine with therapeutic effects against collagen-induced arthritis through the expansion of regulatory T cells and suppression of Th17 cells. *Eur. J. Immunol.* 2007; 37: 3021-3029.
291. Zandian M, Mott KR, Allen SJ, Dumitrascu O, Kuo JZ, et al. Use of cytokine immunotherapy to block CNS demyelination induced by a recombinant HSV-1 expressing IL-2. *Gene Ther.* 2011.

292. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor- $\beta$  and interleukin-10. *Immunity*. 2008; 28: 468–476.
293. Jose U. Scher, Michael H. Pillinger. 15d-PGJ2: The anti-inflammatory prostaglandin? *Clinical Immunology*. 2005; 114:100-109.
294. Sho Hangaia, Tomoka Ao, Yoshitaka Kimuraa, Kosuke Matsuki, Takeshi Kawamura, Hideo Negishi, Junko Nishio, Tatsuhiko Kodama, Tadatsugu Taniguchia, and Hideyuki Yanai. , PGE2 induced in and released by dying cells functions as an inhibitory DAMP. *PNAS*. April 5, 2016; vol. 113, no. 14: 3844-3849.
295. Nolan K. Maier, Stephen H. Leppla and Mahtab Moayeri. The Cyclopentenone Prostaglandin 15d-PGJ2 Inhibits the NLRP1 and NLRP3 Inflammasomes *J Immunol*. 2015, Mar 15; 194 (6): 2776-85.
296. Surh, Y.-J., H.-K. Na, J.-M. Park, H.-N. Lee, W. Kim, I.-S. Yoon, and D.-D. Kim. 15-Deoxy-D,<sup>4</sup>-prostaglandin J2, an electrophilic lipid mediator of anti-inflammatory and pro-resolving signaling. *Biochem. Pharmacol*. 2011; 82: 1335-1351.
297. T. Minami, E. Okuda-Ashitaka, M. Nishizawa, H. Mori, S. Ito, Inhibition of nociceptin-induced allodynia in conscious mice by prostaglandin D2, *Br. J. Pharmacol*. 1997; 122: 605-610.
298. N. Eguchi, T. Minami, N. Shirafuji, Y. Kanaoka, T. Tanaka, A. Nagata, N. Yoshida, Y. Urade, S. Ito, O. Hayaishi, Lack of tactile pain (allodynia) in lipocalin-type prostaglandin D synthase-deficient mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999; 96: 726-730.
299. O. Nosjean, J.A. Boutin, Natural ligands of PPARgamma: are prostaglandin J(2) derivatives really playing the part? *Cell Signalling*. 2002; 14: 573-583.
300. Baba Y, Matsumoto M, Kurosaki T. Signals controlling the development and activity of regulatory B-lineage cells. *Int. Immunol*. 2015 Oct; 27 (10): 487-93.
301. Diana Ahmetpahic, Kathrin Schwarte, Oliver Ambrée, Christian Bürger, Vladislava Falcone, Katharina Seiler, Mehrdad Rahbar Kooybaran, Laura Grosse, Fernand Roos, Julia Scheffer, Silke Jörgens, Katja Koelkebeck, Udo Dannlowski, Volker Arolt, Stefanie Scheu, Judith Alferink. Altered B Cell Homeostasis in Patients with Major Depressive Disorder and Normalization of CD5 Surface Expression on Regulatory B Cells in Treatment Responders. *J Neuroimmune Pharmacol*. September 2017.
302. Rosser EC, Mauri C. Regulatory B cells: origin, phenotype, and function. *Immunity*. 2015; 42: 607-612.
303. D.M. Klinman, F. Takeshita, I. Gursel, C. Leifer, K.J. Ishii, D. Verthelyi, M. Gursel. CpG DNA: recognition by and activation of monocytes. *Microbes and Infection*. 2002; 4: 897-901.

304. M. Gursel, I. Gursel, H. S. Mostowski, and D. M. Klinman. CXCL16 Influences the Nature and Specificity of CpG-Induced Immune Activation. *The Journal of Immunology*. 2006; 177: 1575-1580.
305. Jörg Vollmer, Risini Weeratna, Paul Payette, Marion Jurk, Christian Schetter, Meike Laucht, Tanja Wader, Sibylle Tluk, Ming Liu, Heather L. Davis and Arthur M. Krieg. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 251-262.
306. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S., and Reis E Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004; 303: 1529-1531.
307. Beignon, A.S., Mckenna, K., Skoberne, M., Manches, O., Dasilva, I., Kavanagh, D.G., Larsson, M., Gorelick, R.J., Lifson, J.D., and Bhardwaj, N. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via Toll-like receptor–viral RNA interactions. *J. Clin. Invest.* 2005; 5: 3265–3275.
308. Xu, Y. DNA damage: A trigger of innate immunity but a requirement for adaptive immune homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* 2006; 6: 261–270.
309. Zelenay, S., Elias, F., and Flo, J. Immunostimulatory effects of plasmid DNA and synthetic oligodeoxynucleotides. *Eur. J. Immunol.* 2003; 33: 1382–1392.