

Direcionando proteínas derivadas de patógenos para células responsáveis pela ativação da resposta imune

Directing pathogen-derived proteins to cells responsible for the immune response activation

Silvia Beatriz Buscardin

Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, USP

Resumo. A obtenção de vacinas contra patógenos que afetam a saúde humana tem sido um objetivo constante nos últimos anos. Neste ensaio apresentamos uma estratégia para o desenvolvimento de vacinas que se baseia no direcionamento de uma proteína recombinante derivada de um patógeno para células responsáveis pela ativação da resposta imune conhecidas como células dendríticas. O direcionamento é conseguido através da utilização de um anticorpo quimérico produzido in vitro em fusão com a proteína de interesse e que é capaz de se ligar a um receptor presente na superfície das células dendríticas. Quando injetado em animais, o anticorpo quimérico leva o antígeno até as células dendríticas e o resultado é indução de forte resposta imunológica.

Palavras-chave. *Células dendríticas, vacinação, anticorpos quiméricos.*

Abstract. The obtention of vaccines against pathogens that affect human health has been a constant goal in the last years. In this assay we will present a strategy for the development of vaccines that is based in the targeting of a recombinant protein derived from a pathogen to cells responsible for the immune system activation known as dendritic cells. The targeting is accomplished by using a chimeric antibody produced in vitro in fusion with a protein of interest that is able to bind to a receptor present at the surface of dendritic cells. When injected into animals the chimeric antibody delivers the antigens to the dendritic cells and the result is the induction of a strong immune response.

Keywords. *Dendritic cells, vaccination, quimeric antibodies.*

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as doenças infecciosas são responsáveis por milhões de mortes por ano, especialmente em países em desenvolvimento (WHO report, 2010). Diferentes formas de prevenção ou tratamentos para muitas destas doenças são extremamente urgentes e bem vindos. Uma das formas de prevenção mais eficazes contra patógenos é a vacinação. No século XX, o desenvolvimento de várias vacinas contra agentes infecciosos impediu que milhões de pessoas padecessem de doenças como varíola, difteria, coqueluche, sarampo, poliomielite, hepatite B, entre outras. Porém, ainda existem doenças como a AIDS, tuberculose e dengue para as quais vacinas efetivas ainda não estão disponíveis. No caso de doenças causadas por parasitas, nenhuma vacina realmente efetiva existe. A falta de uma vacina efetiva torna-se ainda mais relevante no caso de doenças parasitárias causadas por protozoários, como é o caso da malária. Anualmente, parasitas do gênero *Plasmodium* são responsáveis por cerca de 300-600 milhões de casos clínicos, matando cerca de 1-3 milhões de pessoas, principalmente crianças (Guerra e col., 2008). Neste caso, o advento de uma vacina

efetiva significaria uma redução maciça tanto na mortalidade quanto na morbidade causada por esta doença.

Várias abordagens tem sido testadas na tentativa de se obter vacinas eficientes contra parasitas. Entre elas podemos citar: imunização com proteínas recombinantes derivadas de diferentes formas do parasita, imunização com vírus recombinantes contendo proteínas parasitárias, imunização com plasmídios de DNA que codificam proteínas inteiras ou diferentes porções das mesmas, entre outras. Todas estas estratégias visam a indução de uma resposta imune eficiente contra a proteína de interesse que seja efetiva no combate ao parasita. No entanto, o mecanismo de apresentação do antígeno parasitário para o sistema imune é pouco conhecido em vários casos e a geração de uma resposta imune eficiente pode estar prejudicada pelo fato de o vírus recombinante, proteína recombinante ou DNA estarem sendo apresentados por células menos especializadas em fazer uma boa apresentação de antígenos.

Neste texto, trataremos de uma estratégia ligeiramente diferente daquelas citadas acima pois o antígeno

Contato do autor:

sbboscardin@usp.br

Recebido 19out09

Aceito 05out10

Publicado 24fev11

é direcionado para células especializadas na ativação do sistema imunológico conhecidas como células dendríticas (DCs).

Características das células dendríticas

As DCs são células apresentadoras de antígenos capazes de iniciar e regular a resposta imune (Steinman e Cohn, 1973). São encontradas na maioria dos tecidos, especialmente pele, mucosas e órgãos linfóides. Além disso, são especializadas na apresentação de antígenos e possuem capacidade migratória, o que faz com que sejam capazes de capturar antígenos na periferia e levá-los até os órgãos linfóides, onde a apresentação de antígenos para células T normalmente ocorre (Steinman, 2008). Outra característica interessante das DCs é que elas possuem uma grande quantidade de receptores endocíticos. Estes receptores são capazes de endocitar seus ligantes ou mesmo anticorpos anti-receptor, ligados a antígenos de interesse. Além de receptores endocíticos, as DCs também possuem receptores que reconhecem diretamente padrões moleculares específicos presentes em vários patógenos (Zanoni e Granucci, 2010). Por exemplo, as DCs reconhecem lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede de bactérias gram-negativas, RNA dupla fita característico de alguns vírus, oligodeoxinucleotídeos CpG não metilados presentes no DNA bacteriano, entre outros. A ligação dessas moléculas faz com que as DCs sofram um processo conhecido como maturação. O processo de maturação resulta em uma série de mudanças fenotípicas que estão ligadas a uma capacidade aumentada de processar antígenos e ativar células T. Estas alterações fenotípicas incluem produção aumentada de complexos peptídeo-MHC (Inaba e col., 2000), aumento da expressão de moléculas que favorecem a ligação a células T (por ex. CD48 e CD58) e de moléculas co-estimulatórias (por ex. CD80, CD86, Inaba e col., 1994), produção de quimiocinas (Sallusto e col., 1999) e de grandes quantidades de citocinas como IL-12 (Edwards e col., 2002) e interferons do tipo I (Dalod e col., 2002).

Estratégia de direcionamento de antígenos para as DCs: estrutura e geração dos anticorpos quiméricos.

Nos últimos anos, uma estratégia que direciona antígenos para as DCs *in vivo* vem sendo desenvolvida com sucesso em modelos animais, e testes clínicos visando o desenvolvimento de uma vacina já estão sendo realizados (The Rockefeller University Newswire, 2010). Esta estratégia consiste na utilização de um anticorpo contra um receptor endocítico (denominado DEC205 ou CD205) presente na superfície de uma subpopulação de DCs em fusão com o antígeno de interesse (Bonifaz e col., 2002; Bonifaz e col., 2004; Hawiger e col., 2001; Hawiger e col., 2004).

Este anticorpo é produzido *in vitro* por transfecção transiente de células HEK293T com dois plasmídios que codificam para as sequências das cadeias leve e pesada+antígeno de interesse (Hawiger e col., 2001). Após a transfecção o anticorpo quimérico é produzido pelas células HEK293T e purificado a partir do sobrenadante das

culturas utilizando-se colunas de proteína G (a proteína G se liga a um sítio localizado na cadeia pesada do anticorpo). A figura 1 mostra um esquema dos passos envolvidos na obtenção do anticorpo quimérico.

A sequência de nucleotídeos do clone anti-DEC205 original (conhecido como NLDC 145) foi clonada, a partir de um hibridoma obtido pela imunização de ratos com estroma de linfonodos de camundongo (Kraal e col., 1986). Para evitar que a própria estrutura do anticorpo (que é de rato) gerasse uma resposta imunológica quando injetado em camundongos, as porções constantes das cadeias leve e pesada de rato foram substituídas por cadeias leve e pesada de camundongo. Do anticorpo original de rato só foram mantidas as regiões variáveis das cadeias leve e pesada, pois são elas que conferem a especificidade de ligação do anticorpo. A sequência da proteína de interesse é sempre fusionada à porção C terminal da sequência da cadeia pesada do anticorpo. Separando estas duas sequências existe uma sequência "linker" que confere certa flexibilidade à molécula e possui um sítio de clivagem de hidrolases que favorece sua degradação no fagossomo da célula dendrítica. A figura 2 mostra uma representação esquemática do anticorpo quimérico anti-DEC205.

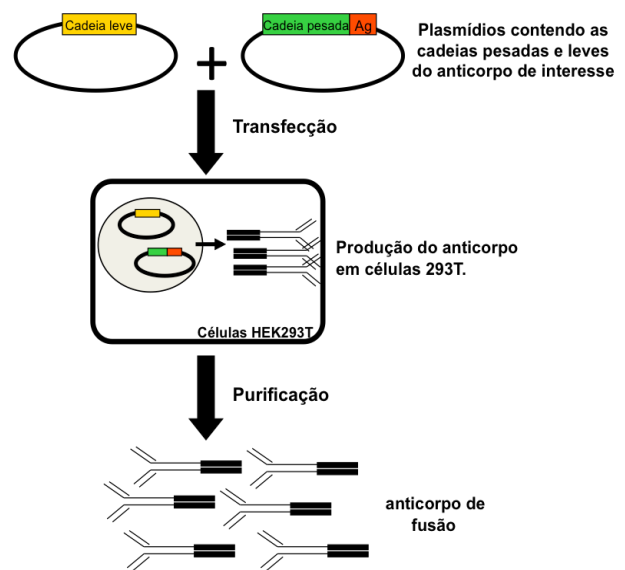


Figura 1. Produção do anticorpo anti-DEC205 em fusão com o antígeno (Ag) de interesse. O anticorpo quimérico é produzido pela cotransfecção de células HEK293T com dois plasmídios codificando as cadeias leve e pesada+antígeno de interesse. Após alguns dias em cultura, os anticorpos quiméricos são purificados do sobrenadante das culturas utilizando-se colunas de proteína G. Adaptado de Boscardin e col. (2009).

Administração de anticorpos quiméricos anti-DEC205 em fusão com diferentes proteínas de interesse.

A administração de baixas doses deste anticorpo quimérico é capaz de ativar células T antígeno-específicas e também induzir a produção de anticorpos. No entanto, esta ativação do sistema imune só ocorre quando o anticorpo quimérico anti-DEC é administrado na presença de um estímulo de maturação para as DCs. Caso contrário, o resultado é tolerância imunológica (Hawiger e col., 2001;

Hawiger e col., 2004). Entre as substâncias capazes de ativar as DCs encontramos moléculas que se ligam a receptores que reconhecem padrões moleculares de patógenos.

A demonstração inicial de que é possível utilizar o anticorpo anti-DEC205 acoplado a um antígeno como uma ferramenta para atingir especificamente as DCs foi descrita no início da década por pesquisadores da Rockefeller University nos Estados Unidos. Nesses estudos, o anticorpo anti-DEC foi conjugado ou fundido diretamente a antígenos modelo como a ovalbumina (OVA, Bonifaz e col., 2002) e lisozima de ovo de galinha (HEL, Hawiger e col., 2001). A administração desses anticorpos quiméricos (anti-DEC-OVA e anti-DEC-HEL) foi capaz de direcionar os antígenos à subpopulação de DCs DEC205⁺ *in vivo*. O antígeno foi então eficientemente processado e apresentado tanto a células T CD4⁺ quanto CD8⁺ transgênicas. Na ausência de inflamação, esse tipo de direcionamento de antígenos resultou na indução de tolerância periférica (medida pela deleção de células T transgênicas específicas para o antígeno utilizado (Bonifaz e col., 2002; Hawiger e col., 2001).

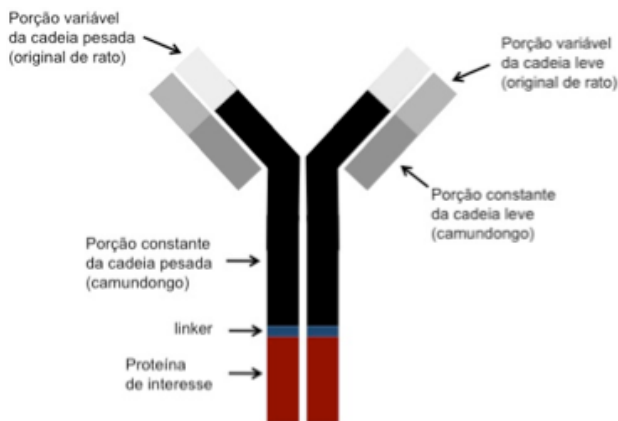


Figura 2. Representação esquemática da estrutura do anticorpo anti-DEC205 quimérico.

Entretanto, o direcionamento de antígenos na presença de um estímulo de maturação, como a administração de anticorpo agonista anti-CD40 (que neste caso faz o papel do CD40L presente na superfície dos linfócitos T), promoveu a ativação prolongada de células T CD4⁺ e CD8⁺. Além disso, a imunidade induzida pelo direcionamento do antígeno às DCs foi de longa duração e mais efetiva do que a administração de potentes adjuvantes como adjuvante completo de Freund (Bonifaz e col., 2004). Camundongos vacinados com o anticorpo anti-DEC-OVA na presença do anticorpo agonista anti-CD40 tornaram-se resistentes à infecção com um vírus vaccinia transgênico expressando OVA (Bonifaz e col., 2004). Além disso, a imunização de animais com o mesmo anticorpo promoveu a ativação de células T CD4⁺ de memória importantes para a ativação de linfócitos B antígeno específicos (Boscardin e col., 2006).

Os estudos citados acima abriram a possibilidade de se utilizar anticorpos quiméricos anti-DEC205 conjugados a antígenos clinicamente relevantes para a indução de imunidade protetora contra diferentes doenças prevalen-

tes.

Boscardin e col. (2006) utilizaram o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína circunsporozoita (CS) expressa pelas formas esporozoitais do *Plasmodium yoelii* (agente causador da malária murina). A administração de uma única dose do anticorpo quimérico anti-DEC-CS na presença de um estímulo de maturação para as DCs foi capaz de induzir células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IFN-g, em diferentes linhagens de camundongos. Além disso, indução de resposta imune humoral também foi observada após a administração de uma dose de reforço do anticorpo, na ausência de qualquer outro adjuvante. O anticorpo anti-DEC205 também já foi acoplado à proteína Gag do vírus HIV e a imunização com o anticorpo quimérico anti-DEC-Gag foi capaz de levar a indução de uma resposta imune mediada principalmente por células T CD4⁺ produtoras de IFN-g. Além disso, proteção foi observada nos animais imunizados com o anticorpo anti-DEC-Gag quando estes foram desafiados com um vírus vaccinia transgênico expressando a proteína Gag (Choi e col., 2009; Trumfheller e col., 2006). A eficácia da imunização com DNA também pode ser aumentada quando se utilizou um plasmídeo codificando para o anticorpo anti-DEC205 em fusão com a proteína Gag (Nchinda e col., 2008).

É interessante ressaltar que as publicações citadas acima utilizaram concentrações relativamente baixas dos anticorpos quiméricos (5-10 mg/camundongo) e foram capazes de gerar respostas imunes tão potentes ou superiores àquelas geradas por imunizações padrão (Boscardin e col., 2006; Trumfheller e col., 2006).

Além de experimentos *in vivo* utilizando camundongos, o anticorpo anti-DEC205 humano também foi utilizado com sucesso para direcionar antígenos para as DCs. Bozzacco e col. (2007) mostraram ativação de linfócitos T CD8⁺ e produção de INF-g quando o anticorpo anti-DEC205 humano em fusão com a proteína Gag do vírus HIV foi incubado com DCs provenientes de pacientes aids e depois incubadas com as células T destes mesmos pacientes. Gurer e col. (2008) obtiveram resultados semelhantes quando utilizaram um anticorpo anti-DEC humano em fusão com o antígeno EBNA-1 do vírus Epstein-Barr.

Os resultados pré-clínicos obtidos com o anticorpo anti-DEC-Gag foram tão promissores que testes clínicos de fase I foram iniciados no primeiro semestre de 2010 (The Rockefeller University Newswire, 2010) e tem como objetivo verificar a segurança, tolerabilidade e imunogenicidade do anticorpo anti-DEC-Gag em seres humanos.

Utilização de anticorpos quiméricos em fusão com proteínas derivadas dos patógenos *Plasmodium vivax* e *Trypanosoma cruzi*.

Nos últimos dois anos, esta tecnologia de produção de anticorpos quiméricos foi trazida ao Brasil e anticorpos fusionados a proteínas derivadas dos parasitas *Plasmodium vivax* e *Trypanosoma cruzi* estão sendo produzidos e testados em nosso país. Estes parasitas foram escolhidos porque tanto a malária quanto a doença de Chagas ainda

são doenças bastante prevalentes no Brasil e vacinas profiláticas ou terapêuticas seriam muito bem vindas.

Considerações finais

Atualmente, vários anticorpos vem sendo utilizados com sucesso no tratamento de doenças em seres humanos (como câncer, por exemplo). Geralmente a administração de anticorpos não é tóxica e é bem tolerada por seres humanos. A utilização de anticorpos monoclonais contra receptores presentes na superfície das DCs fundidos a antígenos de interesse apresenta-se como uma tecnologia nova que possui enorme potencial para ser transposta para estudos em seres humanos. O campo ainda está em sua infância, mas resultados promissores já vem sendo obtidos por diversos grupos.

Atualmente os maiores desafios estão em se encontrar adjuvantes que possam ser utilizados em conjunto com os anticorpos quiméricos para obtenção de duradoura resposta protetora e em se entender como o direcionamento dos antígenos para diferentes sub-populações de DCs afeta a geração da resposta imune. A continuidade das pesquisas nesta área poderá responder diversas perguntas e também contribuir para o desenvolvimento de novas vacinas contra patógenos prevalentes.

Agradecimentos

A autora gostaria de agradecer o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP, processo 2007/08648-9), do Instituto Nacional de Tecnologia de Vacinas (CNPq, subprojeto 15203*12) e do Banco BNP Paribas.

Contribuição dos autores

Redação do artigo: Silvia Beatriz Boscardin.

Bibliografia

- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M. C. e Steinman, R. M. (2002). Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med* 196, 1627-38.
- Bonifaz, L. C., Bonnyay, D. P., Charalambous, A., Darguste, D. I., Fujii, S., Soares, H., Brimnes, M. K., Moltedo, B., Moran, T. M. e Steinman, R. M. (2004). In vivo targeting of antigens to maturing dendritic cells via the DEC-205 receptor improves T cell vaccination. *J Exp Med* 199, 815-24.
- Boscardin, S. B., Hafalla, J. C., Masilamani, R. F., Kamphorst, A. O., Zebroski, H. A., Rai, U., Morrot, A., Zavala, F., Steinman, R. M., Nussenzweig, R. S. e col. (2006). Antigen targeting to dendritic cells elicits long-lived T cell help for antibody responses. *J Exp Med* 203, 599-606.
- Boscardin, S. B., Nussenzweig, M. C., Trumppheller, C. e Steinman, R. M. (2009). Vaccines based on dendritic cell biology. In *New Generation Vaccines* (fourth edition). vol. 1 (ed. M. M. Levine), pp. 327-339. New York: Informa Healthcare.
- Bozzacco, L., Trumppheller, C., Siegal, F. P., Mehandru, S., Markowitz, M., Carrington, M., Nussenzweig, M. C., Piperno, A. G. e Steinman, R. M. (2007). DEC-205 receptor on dendritic cells mediates presentation of HIV gag protein to CD8+ T cells in a spectrum of human MHC I haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 1289-94.
- Choi, J. H., Do, Y., Cheong, C., Koh, H., Boscardin, S. B., Oh, Y. S., Bozzacco, L., Trumppheller, C., Park, C. G. e Steinman, R. M. (2009). Identification of antigen-presenting dendritic cells in mouse aorta and cardiac valves. *J Exp Med* 206, 497-505.
- Dalod, M., Salazar-Mather, T. P., Malmgaard, L., Lewis, C., Asselin-Paturel, C., Briere, F., Trinchieri, G. e Biron, C. A. (2002). Interferon alpha/beta and interleukin 12 responses to viral infections: pathways regulating dendritic cell cytokine expression in vivo. *J Exp Med* 195, 517-28.
- Edwards, A. D., Manickasingham, S. P., Sporri, R., Diebold, S. S., Schulz, O., Sher, A., Kaisho, T., Akira, S. e Reis e Sousa, C. (2002). Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 169, 3652-60.
- Guerra, C. A., Gikandi, P. W., Tatem, A. J., Noor, A. M., Smith, D. L., Hay, S. I. e Snow, R. W. (2008). The limits and intensity of *Plasmodium falciparum* transmission: implications for malaria control and elimination worldwide. *PLoS Med* 5, e38.
- Gurer, C., Strowig, T., Brilot, F., Pack, M., Trumppheller, C., Arrey, F., Park, C. G., Steinman, R. M. e Munz, C. (2008). Targeting the nuclear antigen 1 of Epstein-Barr virus to the human endocytic receptor DEC-205 stimulates protective T-cell responses. *Blood* 112, 1231-9.
- Hawiger, D., Inaba, K., Dorsett, Y., Guo, M., Mahnke, K., Rivera, M., Ravetch, J. V., Steinman, R. M. e Nussenzweig, M. C. (2001). Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J Exp Med* 194, 769-79.
- Hawiger, D., Masilamani, R. F., Bettelli, E., Kuchroo, V. K. e Nussenzweig, M. C. (2004). Immunological unresponsiveness characterized by increased expression of CD5 on peripheral T cells induced by dendritic cells in vivo. *Immunity* 20, 695-705.
- Inaba, K., Turley, S., Iyoda, T., Yamaide, F., Shimoyama, S., Reis e Sousa, C., Germain, R. N., Mellman, I. e Steinman, R. M. (2000). The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli. *J Exp Med* 191, 927-36.
- Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S. e col. (1994). The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 180, 1849-60.
- Kraal, G., Breel, M., Janse, M. e Bruin, G. (1986). Langerhans' cells, veiled cells, and interdigitating cells in the mouse recognized by a monoclonal antibody. *J Exp Med* 163, 981-97.
- Nchinda, G., Kuroiwa, J., Oks, M., Trumppheller, C., Park, C. G., Huang, Y., Hannaman, D., Schlesinger, S. J., Mizenina, O., Nussenzweig, M. C. e col. (2008). The efficacy of DNA vaccination is enhanced in mice by targeting the encoded protein to dendritic cells. *J Clin Invest* 118, 1427-36.
- Sallusto, F., Palermo, B., Lenig, D., Miettinen, M., Matikainen, S., Julkunen, I., Forster, R., Burgstahler, R., Lipp, M. e Lanzavecchia, A. (1999). Distinct patterns and kinetics of chemokine production regulate dendritic cell function. *Eur J Immunol* 29, 1617-25.

- Steinman, R. M. (2008). Dendritic cells in vivo: a key target for a new vaccine science. *Immunity* 29, 319-24.
- Steinman, R. M. e Cohn, Z. A. (1973). Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-62.
- The Rockefeller University Newswire (2010). Disponível em: <http://newswire.rockefeller.edu/index.php?page=engine&id=1081> . Acesso em: 21. Fev. 2011.
- Trumpfheller, C., Finke, J. S., Lopez, C. B., Moran, T. M., Moltedo, B., Soares, H., Huang, Y., Schlesinger, S. J., Park, C. G., Nussenzweig, M. C. e col. (2006). Intensified and protective CD4+ T cell immunity in mice with anti-dendritic cell HIV gag fusion antibody vaccine. *J Exp Med* 203, 607-17.
- WHO (World Health Organization). Disponível em: <http://www.who.int/en> . Acesso em: 17. Fev. 2011.
- Zanoni, I. e Granucci, F. (2010). Regulation of antigen uptake, migration, and lifespan of dendritic cell by Toll-like receptors. *J Mol Med* 88, 873-80.