

3.2. Adyuvantes vacunales

ALFREDO BLANCO QUIRÓS
ROSARIO CAMBRONERO MARTÍNEZ

Puntos clave

- *Los adyuvantes son agentes heterogéneos e inespecíficos que asociados con los antígenos vacunales inducen una respuesta inmunitaria más potente y prolongada.*
- *Los antígenos vacunales son cada vez más purificados y seguros, pero a consta de perder inmunogenicidad.*
- *Los mecanismos de acción de los adyuvantes son múltiples y diferentes. Pueden actuar directamente sobre el sistema inmunitario, o indirectamente, prolongando la persistencia del antígeno vacunal en el organismo.*
- *Los adyuvantes no son igualmente válidos para cualquier vacuna. Dependiendo de la patogenia de cada infección se debe elegir el adyuvante idóneo.*
- *La combinación de adyuvantes diferentes permite aprovechar las características complementarias que tengan, mejorando la eficacia global.*

Cada vez se consiguen vacunas más seguras pero con frecuencia se hace a consta de reducir la respuesta inmunitaria por debajo de lo deseable. La solución a este problema es aumentar su antigenicidad de manera extrínseca, añadiendo unos compuestos denominados adyuvantes. Curiosamente, a medida que se sintetizan vacunas más purificadas y «limpias» disminuye su antigenicidad y con ello aumenta la dependencia de mejores adyuvantes.

Por estas razones, la importancia de los adyuvantes en la vacunología moderna es cada vez mayor. Aunque se experimenta con muchos y excelentes adyuvantes, la mayoría tienen una alta reactogenicidad impidiendo su aplicación en humanos. Es más, su incorporación a vacunas profilácticas para uso sistemático en niños sanos todavía está más restringida que algunas vacunas destinadas a enfermos, sean alérgicos, cancerosos, infectados por VIH, etc.

3.2.1. Definiciones

a) Adyuvantes

Son agentes que añadidos a la formulación vacunal potencian la respuesta inmunitaria frente a los antígenos con los que se encuentran mezclados. Habitualmente además de actuar como estimulantes inmunitarios directos, presentan otras acciones, inflamatoria, «depot» etc., que indirectamente también refuerzan la respuesta. Suelen ser compuestos complejos y heterogéneos.

b) Inmunoestimulantes

Son sustancias que potencian la respuesta inmunitaria del organismo de forma genérica y no precisan ser administrados de forma conjunta al preparado antigénico, ni serlo por la misma vía, ni al mismo tiempo. Al contrario que los adyuvantes, suelen ser compuestos simples y con una única acción.

c) Moléculas portadoras o «carriers»

Generalmente son proteínas que además de potenciar la respuesta inmunitaria, la modifican de una forma cualitativa, haciéndola T-dependiente. Necesitan tener una íntima unión química con el antígeno y no basta con estar mezclados.

3.2.2. Historia

Ramón (1925). Observó que los caballos vacunados que desarrollaban abscesos en el punto de la inoculación producían más anticuerpos que los vacunados en estricta asepsia.

Gleny y col (1926). Descubrieron los efectos potenciadores que tiene la asociación de sales de aluminio a las vacunas, y las denominaron genéricamente como «adyuvantes de alumbre».

Freund (1936). Desarrolló uno de los más potentes adyuvantes conocidos y que lleva su nombre. Se compone de una mezcla de agua y aceites junto con micobacterias. Mas tarde fue modificado por *Stuart-Harris* (1969) quien eliminó las micobacterias para disminuir su gran toxicidad, es llamado adyuvante incompleto de *Freund*.

Greenberg y Fleming (1947). Demostraron que el toxoide diftérico aumentaba la antigenicidad de la vacuna de tos ferina de células enteras.

Johnson y col. (1956). Descubrió el efecto adyuvante de los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias gram negativas, lo que abrió la puerta a diferentes técnicas para detoxificar LPS y poder añadirlo a las vacunas.

3.2.3. Clasificación

Los adyuvantes utilizados en experimentación animal son múltiples y generalmente se les clasifica por su propiedades químicas o físicas, lo que convierte su clasificación casi en una larga relación, resumida en la Tabla I. Otra posibilidad de clasificación se basa en los mecanismos inmunitarios que desencadenan. Sin embargo es común que los mecanismos se solapen, coincidiendo más de uno, o que sean sólo parcialmente conocidos. Por motivos de seguridad, los tipos de adyuvantes adecuados para su aplicación humana son muy limitados.

3.2.4. Mecanismo de acción

Algunos de los mecanismos de acción que se les ha atribuido a los adyuvantes son los que se citan a continuación, pero sin duda pudiera haber otros, incluso aún desconocidos.

a) Retraso de la liberación del antígeno

Tanto las sales de aluminio en el hombre, como los adyuvantes de tipo *Freund* en los animales, mantienen el antígeno durante más tiempo en el sitio de la inoculación. Este fenómeno trae consigo una respuesta inmunitaria de mayor intensidad. A lo largo de muchos años se pensó que esta era el principal, si no único, mecanismo de acción de los adyuvantes vacunales. Actualmente se sabe que las acciones son más complejas y que además de la persistencia física, hay fenómenos inflamatorios con liberación de citoquinas y especialmente una intervención más eficaz de las células presentadoras de antígeno.

Una variante del retraso de liberación lo constituyen los preparados vacunales de administración oral que están incluidos en elementos, como liposomas o microesferas que permiten una resistencia más prolongada de los antígenos a la acción de los jugos gástricos o intestinales.

b) Activación y maduración de las células presentadoras de antígeno (CPA)

En el inicio de la respuesta inmune intervienen de forma fundamental las CPA, células dendríticas y macrófagos entre otras. Para que su respuesta sea más eficaz es preciso que maduren y se activen, aumentando la expresión de las moléculas HLA-DR. Esto ocurre de forma genérica cuando se facilita la fagocitosis y los antígenos pasan al citoplasma, y de una forma más dirigida administrando ciertas citoquinas y moléculas «in situ». El antígeno gD2 del virus Herpes simple 2 en emulsión MF59 pasa al citoplasma y provoca la maduración de las células dendríticas y con ello la activación de los linfocitos.

Tabla I. Clasificación y listado de los principales adyuvantes vacunales

Adyuvantes	Composición o acción	Vacuna
Sales minerales Sales de aluminio Fosfato cálcico	Adsorben el antígeno Adsorben el antígeno	DT, TT Múltiples
Emulsiones MF59 QS21 SBAS-2 SBAS-4 Montanide Detox	Escualeno / agua Saponina purificada Escualeno/agua + MPL + QS21 Gel de alumbre + MPL Emulsión con aceite metabolizable Escualeno / agua + MPL + CWS	Gripe (trivalente), VHB, VHS, VIH (gp120), CMV Malaria (SP1), VIH (gp120), Melanoma Malaria (RTS,S), VIH, VHB, VHS Malaria (MSP1, MSP2) Malaria (R32NS18), melanoma
Sistemas de partículas Liposomas Liposomas + MTP-PE Virosomas ISCOMs Micropartículas PLGA	Vesículas con membrana bi-lipídica Liosomas asociados al lípido sintético MTP-PE Liposomas asociados a proteínas de fusión vírica Micelas de QuilA, colesterol y fosfolípidos Partículas de polímeros, ac. láctico y glicólico	Gripe (monovalente) VIH (gp120) DT, TT, VHA, gripe (Inflexal®) Gripe (trivalente), VPH16, H.pylori VIH, TT
Agonistas de TLR MPL RC-529 OM-174 CpG oligonucleótidos Imiquimod Poly (I:C) HSP	Monofosforil lípido A de Salmonella minnesota (R595) Análogo sintético de MPL Derivado del lípido A Oligonucleótidos con motivos CG (TLR9 agonista) Derivado de imidazol (TLR7 agonista) RNA bicatenario (TLR3 agonista) ¿TLR agonista?	VHS, VHB, Malaria, VSR, VHB (AgHBs), VIH Malaria (CSP), cáncer VHB (HBsAg), VIH, gripe (trivalente), melanoma VHS, VPH VIH, cáncer VPH, VHB, VHC, VHS
Otros Citoquinas Toxinas	IL-2, IL-12, GM-CSF, IFN γ , etc. Toxina colérica. Toxina de E. coli, etc.	Malaria (CSP, MSP1), VHB, VHA, Diferentes vacunas orales

CWS (cell walk squeleton de *Mycobacterium phlei*; HSP (heath shock protein); ISCOM (immunostimulating complex); MPL (monophosphoryl lipid A); MDP (muramyl dipeptide); PLGA (poly-lactide-glycolic acid); TLR (toll like receptor); DT y TT: Toxina diftérica y tetánica; VPH: Virus del papiloma humano; VSR: Virus sincitial respiratorio VHA, VHB y VHC: Virus de hepatitis A, B y C; VHS: Virus herpes simple; VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

tos T. Por otra parte, el Resiquimod (R-848) las activa a través de un aumento de citoquinas como IL-12 o IFN α , lo que se demuestra por el aumento de expresión en su superficie celular de CD80, CD83, CD86 y CD40, moléculas co-estimuladoras necesarias para una completa activación de los linfocitos T.

c) Modificación del equilibrio Th1/Th2

Los linfocitos T CD4+ o «helper» (Th) se dividen en dos tipos (Th1/Th2) según el perfil de citoquinas que liberan. La activación de los linfocitos Th1 lleva a la síntesis de IL-2, IFN γ , IL-12 etc. y ponen en marcha una respuesta celular retardada especialmente eficaz contra agentes infecciosos intracelulares. Los Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10,

etc. facilitan la síntesis de anticuerpos, incluida IgA secretora e IgE, y son más eficaces en la defensa contra microorganismos presentes en el espacio extracelular. Con mucha posterioridad a su empleo, se comprobó que los adyuvantes de aluminio que priman la síntesis de anticuerpos lo hacen a través de una estimulación Th2. Lo mismo sucede con ciertas toxinas, como la colérica. Hay vacunas, frente a la tuberculosis, leishmaniasis, etc. en las que sería deseable conseguir una activación Th1, ya que estas infecciones son eminentemente intracelulares. En este supuesto, los objetivos coinciden con los de las vacunas anti-alérgicas donde también se pretende frenar la actividad Th2.

Actualmente hay múltiples vías de investigación dirigidas a modificar con adyuvantes la relación Th1/Th2. Una de las más avanzadas es la producción de ciertas secuencias de ADN muy pequeñas y repetitivas que contienen guanina, denominadas oligodesoxinucleótidos CpG (ODN CpG). Se ha comprobado su eficacia para facilitar una respuesta Th1, incluso reconduciendo una respuesta ya previamente enfocada hacia el patrón Th2, como ocurre en los alérgicos.

d) Citoquinas adyuvantes

Otra línea de adyuvantes Th1 se fundamenta en la incorporación al preparado vacunal de citoquinas para que modifiquen la repuesta inmunitaria. Se usan IFN γ , IL-2 y con preferencia IL-12. Aunque los resultados experimentales son buenos, en un ensayo clínico en humanos con vacuna neumocócica e IL-12 las reacciones, fiebre y malestar, fueron excesivas para su incorporación en vacunas profilácticas. Se buscan alternativas, como usar moléculas químicas que estimulen la síntesis endógena de IL-12 en lugar de su administración exógena.

3.2.5. Principales tipos de adyuvantes

a) Sales de aluminio

Son los adyuvantes más utilizados, habiéndose inyectado cientos de millones de inyecciones. Las sales más habituales son el hidróxido de aluminio (exactamente, oxihidróxido de aluminio), el fosfato de aluminio (hidroxifosfato) y el alumbre. El hidróxido de aluminio tiene una morfología en fibras lo que le proporciona una gran superficie, dato clave para la adsorción de los antígenos. Se disuelve bien en pH ácido y básico, pero no en el pH 7.4 del líquido intersticial. El fosfato tiene una presentación amorfa y con ello amplia superficie de contacto. También se disuelve mal en el pH del líquido intersticial, aunque mejor que el hidróxido. Alumbre se llamó al adyuvante producido al precipitar «in situ» el antígeno con la sal de aluminio, generalmente sulfato potásico. Sus características son parecidas a las del fosfato de aluminio. A pesar del pH neutro del líquido intersticial, una vez inyectada la vacuna con adyuvante de aluminio comienza una lenta solubilización, favorecida por la presencia de ácidos plasmáticos, cítrico, láctico, málico, etc. calculándose que al mes ya se ha solubilizado y pasado a la circulación sanguínea entre el 17% y el 51%, según sea hidróxido o fosfato de aluminio respectivamente. Una nueva variante de sales de aluminio es el hidroxifosfato sulfato de aluminio amorfo (AAHS) incorporado a la formulación de una vacuna contra el virus del papiloma humano (Gardasil®).

Paradójicamente, a pesar de la larga experiencia el mecanismo de las sales de aluminio sigue discutido. Es probable que se asocien diferentes circunstancias. Se afirma que causan una inflamación que atrae gran cantidad de CPA ampliando la posibilidad de contactar con los antígenos inmovilizados «in situ». Además, ahora se afirma que los antígenos unidos al aluminio muestran una presencia particulada, en lugar de soluble, con ello son fagocitados por los macrófagos mediante picnocirosis, pasan al citoplasma y probablemente en estas circunstancias induzcan una respuesta inmunitaria más intensa que frente a antígenos solubilizados.

Aunque hayan sido tan utilizado, las sales de aluminio presentan puntos débiles, son adyuvantes bastante débiles en algunas situaciones y que prácticamente no potencian la respuesta inmunitaria celular. Además, se ha reiterado que estimulan la respuesta alérgica mediada por IgE.

Otras sales minerales

Además de las sales de aluminio también se han probado sales de calcio, hierro, zirconio, etc. De todas ellas, el fosfato cálcico ha sido utilizado ocasionalmente en humanos, como componente de alguna vacuna pertussis y se afirmó que con muy baja reactividad neurológica.

b) Adyuvantes tensoactivos

Las saponinas son glicósidos tensoactivos gracias a un núcleo molecular hidrofóbico. Inducen una fuerte respuesta T-dependiente y T-independiente junto con activación citotóxica mediada por linfocitos T CD8+. Son particularmente efectivos y útiles en la inmunidad de las mucosas. El Quil A, compuesto por 23 saponinas, se utiliza mucho en experimentación animal. Un derivado del Quil A, mucho menos tóxico, es el QS-21, potente activador Th1, que se ha mezclado a otros adyuvantes (AS02A y AS01B) en vacunas humanas contra malaria y tuberculosis, aún en fase de ensayo.

c) Adyuvantes derivados de bacterias

Preferentemente son moléculas (peptidoglicanos o lipopolisacáridos) de la pared de bacterias gram negativas, como *Mycobacterium spp.*, *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis*, *Neisseria meningitidis* o *Salmonella minnesota*. Actúan a través de su unión a los receptores tipo-toll (TLR=toll-like receptor) de las células presentadoras de antígeno. Quizás la más activa sea la muramil-L-alanyl-D-isoglutamina (MDP), por desgracia demasiado tóxica para su uso en humanos. Por esta razón se desarrollaron derivados menos tóxicos, como la treonil-MDP, libre de acción pirógena.

Otra vía investiga los lipopolisacáridos (LPS) que son potentes mitógenos de linfocitos B e también inductores de la producción de IFN γ por los linfocitos T. Uno de los preparados es la trealosa dimicolato (TDM), pero el más apropiado para vacunas humanas sea el monofosforil lipid A (MPL) en el que se hidroliza el lípido A lo suficiente para mantener la inmunogenicidad pero eliminando su toxicidad.

En estudios genéticos con micobacterias surgió una alternativa a los adyuvantes bacterianos, al descubrirse que pequeños fragmentos de ADN ricos en motivos repetitivos CpG se comportan como adyuvantes también por su capacidad para unirse a moléculas TLR.

d) Emulsiones

Son mezclas de agua en aceite (W/O) o de aceite en agua (O/W) que producen un depósito en el lugar de la inyección que retienen el antígeno durante un tiempo prolongado, al menos las de tipo W/O. Son adyuvantes demasiado tóxicos para vacunas profilácticas de uso rutinario, causando inflamación, granulomas e incluso ulceraciones locales. Aún así, el Montanide (W/O) se ensayó en vacunas contra VIH, malaria o cáncer de mama.

e) Liposomas

Son esferas sintéticas de membrana lipídica, dentro de las cuales se incluye el antígeno proteico o liposacárido. Permiten alargar la vida media del antígeno en sangre. Aunque se emplean bastante en otras terapias, hasta ahora lo ha sido poco en vacunas profilácticas, salvo para vacunas frente al virus de la gripe (Inflexal®).

f) Adyuvantes de microesferas de polímeros

Consiste en la unión de antígeno con diferentes polímeros biodegradables. La teoría de este sistema es muy sugestiva porque dependiendo de la proporción polímero-antígeno se puede graduar la vida media del preparado vacunal. Hasta ahora se dispone de poca experiencia en humanos.

g) Citoquinas como adyuvantes

En concreto se ha pensado asociar interferón gamma (IFN γ) como estimulador de inmunidad humoral y celular, o factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) como attractante y activador de células presentadoras de antígeno. Hay importantes limitaciones para ser usadas en vacunas profilácticas, como es su alto coste, la necesidad de múltiples dosis, su antigenicidad como proteína heteróloga que es, o la excesiva reactogenicidad que presentan, con fiebre elevada y síntomas seudo gripales. Se baraja una posibilidad de aplicación en las vacunas de ADN, aprovechando el mismo vector en el que se incorpora el gen codificador del antígeno vacunal para añadir otro gen que codifique la citoquina que deseamos que acompañe a la vacuna.

3.2.6. Combinación de adyuvantes

Las mezclas de diferentes adyuvantes son cada vez más ensayadas, buscando que sus acciones inmunitarias sean complementarias. Alguna de las más avanzadas se reseñan en la tabla II, como son las que asocian sales de aluminio con derivados del lípido A (AS04) ya utilizado en vacunas comercializadas.

a) Adyuvante AS04

Es uno de los pocos adyuvantes modernos e innovadores autorizado para su uso en la formulación de vacunas profilácticas para su uso en humanos. La principal novedad que incorpora es la asociación de dos adyuvantes de actividad complementaria: el clásico hidróxido de aluminio y el monofosforil lípido A (MPL). El MPL es un lipopolisacárido obtenido de *Salmonella minnesota* que es purificado y detoxificado, pero que mantiene intacta su capacidad de unirse al TLR-4 (toll like receptor-4) y a través de este

Tabla II. Algunos nuevos adyuvantes utilizados en vacunas humanas

Código	Composición	Enfermedad	Características	Situación
IC31	ODN1a + KLK5LKLK	Tb	Induce inmunidad celular y humoral	Ensayo fase I
AS04	Hidróxido aluminio + MPL	Hepatitis B	Mayor título de ac. Citotoxicidad por linf. T	Comercializada (Fendrix®)
		VPH	Mayor título de ac. Aumento de linf. B memoria	Comercializada (Cervarix®)
		Gripe H5N1	Seroprotección en el 80%	Ensayos clínicos
AS02A	QS-21 + MPL en emulsión	Malaria	Alta respuesta ac.	Ensayos fase III
		Tb	Induce inm. celular y humoral	Ensayo fase I
AS01B	QS-21 + MPL en liposomas	Malaria	Superior inm. celular que la emulsión	Ensayo fase I

Resumido de Fraser CK y col (2007)

acoplamiento activar las células presentadoras de antígeno (CPA), que expresan gran cantidad de TLR-4. Las CPA participan en la respuesta de inmunidad innata y además inicia la respuesta de inmunidad adquirida al presentar el antígeno a linfocitos T. Parece cada vez más seguro que las CPA realizan una elección celular que resulta fundamental para la subsiguiente reacción, al menos en el sentido Th1 o Th2.

La asociación de hidróxido de aluminio + MPL consigue una respuesta mediada por anticuerpos más intensa y prolongada, apoyada en la mayor producción de linfocitos B memoria. Además, el componente MPL induce una potente respuesta Th1 que es fundamental para la respuesta frente a virus y bacterias situadas intracelularmente.

Hasta ahora, el adyuvante AS04 se ha utilizado en una vacuna frente al virus de la hepatitis B (Fendrix®), indicada preferentemente en enfermos en hemodiálisis y situaciones de inmunosupresión, y más recientemente en una vacuna contra el virus del papiloma humano (Cervarix®)

b) Otras mezclas de adyuvantes

Otra mezcla es la de sales de aluminio con algammulin (inulina-g), aprovechando que la inulina es un potente activador natural de la vía alternativa del complemento. Quizás el preparado más complejo y elaborado de adyuvantes sean los llamados IS-COMS o complejos inmunoestimulantes. Son partículas dodecahédricas similares a virus y compuestas por Quil A, lípidos y colesterol, en las que se insertan los antígenos como si fueran auténticas «cajas». Se pueden administrar por vía mucosa y son una excelente alternativa de futuro cuando se mejore su estabilidad y toxicidad.

Información complementaria sobre adyuvantes combinados se puede recoger en las revisiones de B Guy y de CK Fraser (2007)

Bibliografía

- Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccines adjuvants revisited. *Vaccine* 2007;25: 3752-62
- Cambroner Martínez R, Blanco Quirós A. Papel de los adyuvantes en las vacunas frente al virus del papiloma humano (VPH). En, Delgado A. Infección por el virus del papiloma humano (VPH). Monografía de la AEP 2008; nº 8: pag. 115-126
- Espuelas S, Irache JM, Gamazo C. Synthetic particulate antigen delivery systems for vaccination. *Inmunología* 2005; 24:208-223
- Fraser CK, Diener KR, Brown MP, Hayball JD. Improving vaccines by incorporating immunological co-adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6:559-578
- Garçon N, Comes P, Van Mechelen M. GSK adjuvant systems in vaccines: concepts, achievements and perspectives. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6:723-739
- Giannini SL, Hanon E, Moris P, Van Mechelen M, Morel S, Dessy F, et al. Enhanced humoral and memory B cellular immunity using HPV16/18 L1 VLP vaccine formulated with the MPL/aluminium salt combination (AS04) compared to aluminium salt only. *Vaccine* 2006; 24:5937-49.
- Guy B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research. *Nature Rev Microbiol* 2007; 5:505-517
- Kenney RT, Edelman R. Survey of human-use adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2003; 2:167-188
- Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines* 2007; 6:673-684
- Lima KM, Dos Santos SA, Rodrigues JM, Silva CL. Vaccine adjuvant: it makes the difference. *Vaccine* 2004; 22: 2374-79
- Lindblad EB. Aluminium adjuvants- in retrospect and prospect. *Vaccine* 2004; 22:3658-68
- Parham P. Profilaxis de las enfermedades infecciosas por medio de la vacunación. En, Parham P, *Inmunología* 2ª ed. Panamericana. Madrid 2006; pag 413-426
- Pashine A, Valiante NM, Ulmer JB. Targeting the innate immune response with improved vaccine adjuvants. *Nat Med.* 2005;11 Suppl 4:S63-68
- Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunol Cell Biol* 2004; 82:488-496
- Salleras L. Bases inmunitarias de las vacunas. En, Salleras L, *Vacunaciones preventivas*, 2ª ed. Masson 2003; pag. 39-78
- Seya T, Akazawa T, Tsujita T, Matsumoto M. Role of Toll-like receptors in adjuvant-augmented immune therapies. *eCAM* 2006;3:31-38