

VACUNAS DE ADN: UNA NUEVA Y PROMISORIA MANERA DE INDUCIR INMUNIDAD PROTECTORA

DNA VACCINES: A NEW AND PROMISING APPROACH TO INDUCE PROTECTIVE IMMUNITY

Gemma Armengol¹, Sergio Orduz¹

Resumen

La reciente tecnología de las vacunas de ADN representa un paso potencialmente revolucionario en el desarrollo de la vacunación. Su mayor ventaja es su capacidad de generar respuesta inmune celular y humoral, eliminando muchos de los problemas asociados con las vacunas tradicionales. La vacunación con ADN consiste en la introducción directa de ADN plasmídico desnudo en la célula, de manera que se puede lograr la expresión de una proteína antigénica dentro de la célula transfectada. Desde que fueron producidas por primera vez, cientos de publicaciones han reportado la eficacia de las vacunas de ADN en modelos animales contra enfermedades infecciosas, contra cáncer y contra enfermedades autoinmunes, y se han iniciado los primeros estudios clínicos en humanos.

Palabras clave: vacunas, ADN, inmunidad.

Abstract

The recent DNA vaccine technology represents a revolution in the vaccine development. Its major advantage is its ability to develop cellular and humoral immune response, overcoming most of the problems associated to traditional vaccines. DNA vaccines consist of direct introduction of naked plasmid DNA in a cell that results in the expression of the antigenic protein inside the transfected cell. Since these vaccines were first produced, hundreds of publications have reported the efficacy of DNA vaccines in animal models against infectious diseases, against cancer and against autoimmune diseases, and the first clinical trials have been started.

Key words: vaccines, DNA, immunity.

INTRODUCCIÓN

La reciente tecnología de las vacunas de ADN representa un paso potencialmente revolucionario en el desarrollo de la vacunación. Desde que Jenner inmunizó con éxito humanos contra la viruela hace dos siglos, la vacunación mediante la inmunidad inducida se ha convertido en la medida de salud pública más efectiva contra las enfermedades infecciosas. Se considera que la vacunación es una de las tecnologías médicas con mayor costo-beneficio de la historia. Según la Organización Mundial de la Salud, existe una

necesidad global de ampliar el impacto de los programas de vacunación a la prevención de enfermedades infecciosas que están asociadas mundialmente con alto nivel de mortalidad o morbilidad y que no son por el momento prevenibles con la inmunización en la infancia. Este objetivo requiere la iniciación de nuevas estrategias en el diseño de vacunas, como son las vacunas de ADN, particularmente para las enfermedades diarreicas (cólera, shigellosis), parasitarias (malaria, esquistosomiasis), infecciones

Recibido: septiembre de 2000; aprobado para publicación: febrero de 2001.

¹ Unidad de Biotecnología y Control Biológico, Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, apartado 7378. E-mail: sorduz@epm.net.co.

respiratorias agudas, SIDA (virus de la inmunodeficiencia humana, VIH) y tuberculosis (Schödel *et al.*, 1994).

El reciente desarrollo de vacunas basadas en ácidos nucleicos (vacunas de ADN) es de particular interés para varias enfermedades "olvidadas", en vista de su capacidad de generar respuesta inmune celular y humoral eliminando muchos de los problemas asociados con las vacunas tradicionales. Además, este nuevo método puede contribuir a la transferencia simplificada de vacunas a nivel global por medio del desarrollo de vacunas combinadas y de dosis única (Tighe *et al.*, 1998).

VACUNAS TRADICIONALES

Las vacunas tradicionales se basan en el uso de microbios patógenos o de sus componentes antigénicos. Hay varias clases de vacunas: atenuadas, muertas, subunidades proteicas, péptidos sintéticos, acelulares y las recombinantes. Las atenuadas son microorganismos vivos con patogenicidad reducida y son generalmente las más efectivas. Son en general bastante potentes en generar inmunidad celular y humoral de gama amplia, pero su uso se ve obstaculizado por razones de bioseguridad. Pueden producir complicaciones si el agente de la vacuna crece sin control o revierte a una forma más patogénica. Además, están contraindicadas en pacientes inmunocomprometidos, porque pueden causar enfermedades severas. Otros problemas de seguridad potenciales son la infección persistente y la inducción a hipersensibilidad para antígenos virales en el hospedero. Por el contrario, las vacunas muertas, los péptidos sintéticos, las subunidades y las vacunas acelulares son más seguras, pero han sido a menudo inadecuadas con respecto a la eficacia y sólo estimulan respuestas humorales limitadas. Además, requieren múltiples dosis, por lo que se aumenta el costo y se crean problemas logísticos. En las vacunas recombinantes, el gen que codifica para un antígeno es insertado en un vector de expresión no patogénico (normalmente un virus) por ingeniería genética. Este tipo de vacu-

nas sólo pueden ser usadas una vez porque el sistema inmune también responderá al vector y en general no inducen respuesta celular (Zhou *et al.*, 1994). Por tanto, las futuras vacunas deben combinar eficacia y seguridad, y contener todos los posibles epítopes (fragmentos proteicos antigénicos) para células B y T, mientras que al mismo tiempo deben evitar epítopes con efectos secundarios negativos tales como el incremento de una infección futura potencial o autoinmunidad. Lo más importante es que los antígenos deben ser presentados al sistema inmune en una manera que imite la infección natural por el patógeno. Muchas de las estrategias actuales implican vacunas que inducen anticuerpos neutralizantes, mientras que las vacunas de ADN representan un nuevo y poderoso método en su desarrollo, ya que inducen con eficacia ambas respuestas, humoral y celular, incluyendo linfocitos T citotóxicos (LTC) (Seder y Gurunathan, 1999).

Además, para que las vacunas sean efectivas necesitan proveer una dosis suficiente de antígeno durante periodos suficientemente largos como para inducir una respuesta secundaria (de memoria). Esto implica un problema en las vacunas tradicionales, mientras que las de ADN pueden efectivamente producir copias de antígenos patogénicos durante largos periodos, normalmente hasta que la célula hospedera es atacada por la respuesta inmune que indujo (Beard y Mason, 1998).

VACUNAS DE ADN

La vacunación con ADN consiste en la introducción directa de ADN plasmídico desnudo en la célula, por medio de una inyección o por bombardeo con partículas de tungsteno o de oro recubiertas del ADN, de manera que se puede lograr la expresión de una proteína antigénica dentro de la célula transfectada. El plásmido, un segmento de ADN bacteriano circular, se construye con un origen de replicación que no sea funcional en las células eucariotas; tales plásmidos no se replican en el hospedero mamífero ni se integran en el ADN cromosómico del animal (figura 1).

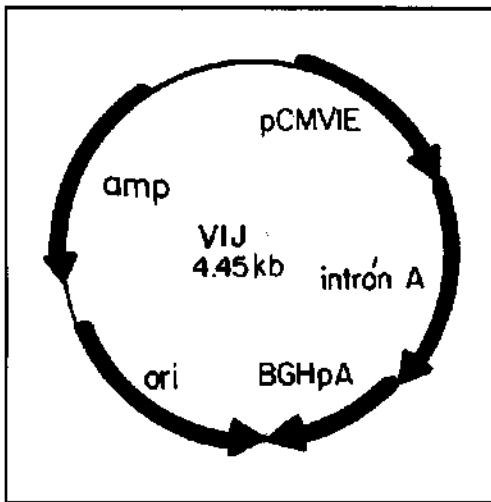


Figura 1. Componentes funcionales de las vacunas de ADN: un sistema promotor fuerte de células eucariotas (p. ej. el promotor de citomegalovirus pCMVIE con el intrón A), un sitio de clonación para la inserción del gen de interés, una secuencia de terminación poliadenilada (p. ej. BGHpA), un origen de replicación procariótico (ori), y un marcador selectivo (p. ej. el gen de resistencia a la ampicilina, amp)

Las vacunas de ADN fueron producidas por primera vez en 1990 cuando se inyectó ADN plasmídico purificado en células musculares de ratón y se logró expresión de los genes plasmídicos (Wolff *et al.*, 1990). Desde entonces, cientos de publicaciones han reportado su eficacia en modelos animales desde ratones hasta primates, contra enfermedades infecciosas humanas y animales, contra cáncer y contra enfermedades autoinmunes, y se han iniciado los primeros estudios clínicos en humanos.

El método es conceptualmente simple; es una manera de decirle a un organismo cómo producir sus propias vacunas. Por ejemplo, para que un ratón haga una vacuna contra el virus de la influenza A, se toma la secuencia génica del virus que codifique para una proteína de superficie del virus conocida como inmunogénica, por ejemplo, la hemaglutinina (HA). Entonces, se inserta este gen en un plásmido, junto con secuencias accesorias, tales como promotores y potenciadores, que se necesitan para asegurar la expresión adecuada del gen foráneo en su nuevo hospede-

ro. Después se inyectan los constructos del plásmido de ADN (tan poco como 1 μ g) en los músculos de la pierna del ratón. Al cabo de unas dos semanas, se detectan altos niveles de anticuerpos contra HA en el suero de estos animales. Al desafiar a los ratones con dosis normalmente letales del virus de la influenza A, se verá que todos los vacunados, y sólo un 10% de los controles, sobrevivirán (Maurice, 1995). También se puede usar un gen para una molécula interna del virus de la influenza, como la nucleoproteína (NP), que se mantiene conservada entre las diferentes cepas del virus. De esta manera, se conseguirán niveles similares de protección contra cualquier cepa del virus de la influenza. Pero, lo que es más importante, se protegerán los animales contra cepas que son bastante diferentes de la cepa de vacunación, una ventaja distinta sobre las vacunas corrientes de influenza, que se deben cambiar para adaptarse a los virus de influenza de cada brote infeccioso. Se puede optar también por una variante de la técnica original, usando "pistolas de genes" para disparar en la epidermis pequeñas partículas de oro o tungsteno recubiertas de ADN plasmídico, y en tal caso se puede utilizar tan poco como 0.4 μ g de ADN para conseguir protección para la influenza A en ratones (Maurice, 1995).

Los principales componentes funcionales del plásmido incluyen un promotor fuerte (como el promotor de citomegalovirus), un sitio de clonación conveniente para la inserción del gen de interés, una secuencia de terminación de poliadenilación, un origen procariótico de replicación para la producción en *Escherichia coli*, y un marcador selectivo (p. ej. el gen de resistencia a la ampicilina) para facilitar la selección de las células que contiene el plásmido (figura 1). Cuando el ADN es inyectado en el tejido muscular, al principio es poco el que va directamente a las células. Por el contrario, el ADN reside en el espacio extracelular del tejido hasta que las células musculares lo internalizan. Según evidencias obtenidas por experimentos *in vivo* e *in vitro*, las células toman el ADN plasmídico vía un proceso endocítico; así, el ADN plasmídico escapa de alguna manera del

ambiente potencialmente adverso del lisosoma endosómico antes de ser transportado al núcleo, el sitio de transcripción. A partir de muestras de varios tejidos que se han evaluado, se ha encontrado que la expresión proteica es consistentemente más elevada en el músculo (Ulmer *et al.*, 1996), aunque recientemente también se ha descrito expresión de antígenos introducidos en la epidermis como una de las aplicaciones más prometedoras (Falo, 1999).

En el caso de transferencia de ADN por bombardeo de partículas, la fuerza de propulsión probablemente conduce las partículas a través de la membrana plasmática de la célula. Después, las moléculas de ADN se disocian de estas partículas y son transportadas al núcleo. Así, cualquiera de las células en el camino de los proyectiles pueden recibir el ADN, obviando la necesidad de un mecanismo de introducción (Ulmer *et al.*, 1996).

Las vacunas de ADN inducen la producción de anticuerpos y respuestas en células T CD4+ (ayudadoras) en animales, pero su mayor ventaja a nivel inmunológico ha sido su capacidad de inducir respuestas de células T CD8+, incluyendo los LTC, lo cual es el mecanismo mayor de protección contra patógenos intracelulares (Wang *et al.*, 1998).

Aún no se sabe con claridad cómo las vacunas de ADN inducen estas respuestas, pero las evidencias sugieren que el ADN foráneo después de haber entrado en la célula, se mantiene extracromosómico y expresa sus productos antigénicos de tal modo que son correctamente procesados en fragmentos peptídicos (figura 2). Estos fragmentos son entonces transportados a la superficie celular por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I para ser presentados a las células T citotóxicas CD8+ (asesinas). Sin embargo, las células musculares por sí solas no son consideradas capaces de presentar antígenos eficazmente. Las células clave involucradas en el proceso de presentación en el caso de inyección intramuscular de ADN plasmídico son las dendríticas, unas células presenta-

doras de antígeno (CPA) potentes derivadas de médula ósea. Estas células están distribuidas en el organismo para optimizar la captura antigénica y migran a los órganos linfoides para seleccionar los clones de células CD4+ y CD8+. Allí estimulan las células B y T vírgenes y de memoria, e inician la respuesta inmune. Esas CPA profesionales pueden tomar, procesar y presentar el antígeno a las células T con señales coestimuladoras requeridas para la activación de células T.

En general, es probable que el ADN sea primariamente expresado en CPA débiles, como las células dérmicas y musculares. Subsecuentemente el antígeno expresado puede ser tomado por CPA profesionales y procesado. Las células dendríticas aisladas a partir de animales vacunados expresan el ADN vacuna. Además, se ha reportado que la respuesta inmune a las vacunas de ADN puede ser incrementada por la inmunización con ADN transferido a las células dendríticas, que se cree son las que facilitan la inducción de los LTC *in vivo*. Estas células procesan y presentan los péptidos correspondientes a las células específicas T y así pueden activar ambas células CD4+ y CD8+.

La inyección intramuscular requiere un volumen relativamente grande de solución salina comparado con el tamaño del músculo para que la solución de ADN pueda llegar a las células dendríticas en los nódulos linfáticos de drenaje en el lugar de inoculación. Se ha hipotetizado que esto podría conducir a la transferencia de ADN a las células dendríticas. Por otro lado, la inmunización genética cutánea resulta en la introducción de ADN en las células dendríticas derivadas de la piel (Kucerova, 1998).

Así pues, las vacunas de ADN inducen eficazmente anticuerpos y LTC en varios tipos de modelos animales de enfermedades infecciosas humanas y animales (Seder y Gurunathan, 1999). Los anticuerpos primarios neutralizan los patógenos y previenen o limitan la infección, mientras que los LTC reconocen y lisan las células infectadas por el patógeno y ayudan a eliminar la

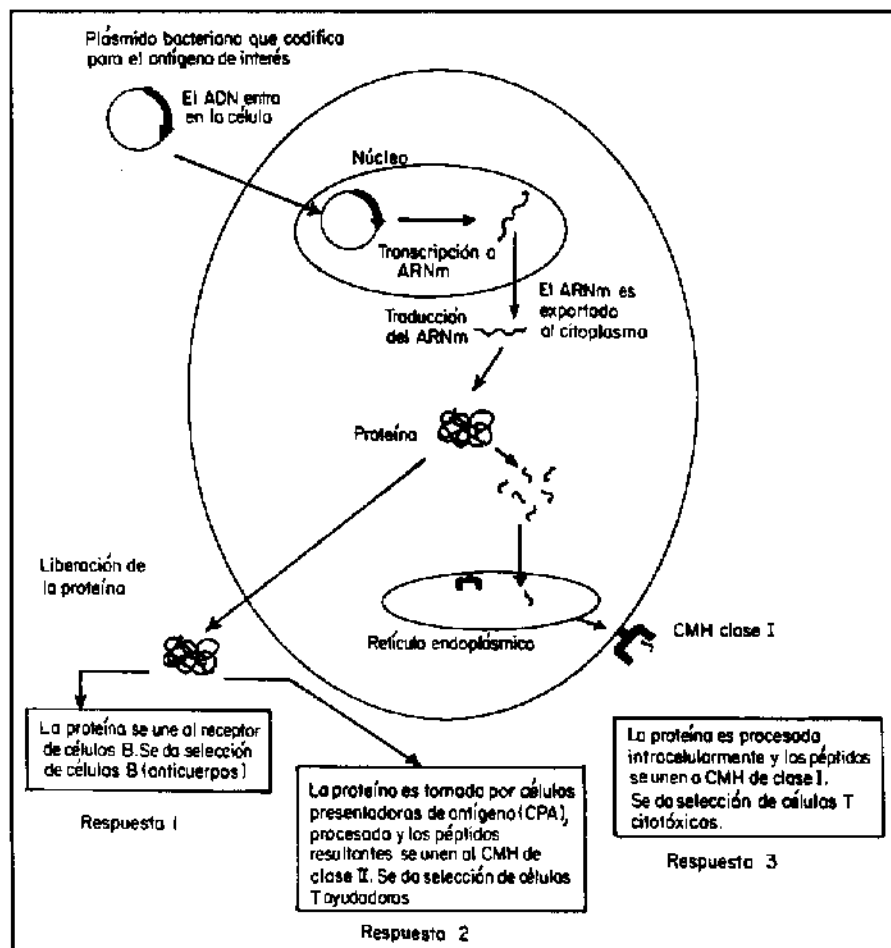


Figura 2. Representación esquemática de los pasos requeridos para la respuesta inmune a los antígenos codificados por ADN. Mientras que la mayoría de vacunas sólo proporcionan respuesta 1 y 2, las vacunas de ADN también provocan respuesta 3

infección. La inducción de ambos brazos del sistema inmune es una ventaja distintiva de las vacunas de ADN (Tighe *et al.*, 1998).

Un reto para el desarrollo de vacunas contra virus tales como la influenza A o el VIH es la diversidad de las proteínas de la cubierta viral entre distintos aislados o cepas. Debido a que los LTC en ratones y humanos son capaces de reconocer epítopes derivados de proteínas virales internas conservadas y a que son importantes en la respuesta inmune contra los virus, se han dirigido esfuerzos hacia el desarrollo de vacunas en las que los LTC sean capaces de proveer protección heteróloga contra diferentes cepas virales. Los péptidos virales asociados con moléculas CMH

de clase I son derivados de proteínas virales sintetizadas endógenamente, sin considerar la localización de las proteínas o la función en el virus. Así, por reconocimiento de los epítopes de proteínas virales conservadas, los LTC pueden proveer protección cruzada de diferentes cepas. Los péptidos capaces de asociarse con moléculas de CMH de clase I para el reconocimiento de LTC se originan a partir de proteínas que están presentes o pasan a través del citoplasma o del retículo endoplásmico. En cambio, las proteínas exógenas, que entran en el camino de procesamiento endosómico como en el caso de antígenos presentados por moléculas CMH de clase II, no son efectivas en generar respuestas LTC CD8+ (Ulmer *et al.*, 1993).

DESARROLLO Y APLICACIONES DE LAS VACUNAS DE ADN

Desde los primeros experimentos, las vacunas de ADN se han investigado en una variedad de sistemas animales que incluyen ratones, ratas, conejos, pollos, peces, hurones, cerdos, perros, vacas y primates no humanos, como macacos y chimpancés, y se están iniciando pruebas en humanos.

Varios laboratorios han usado la influenza como un sistema modelo en diferentes especies animales (ratones, hurones, primates no humanos y pollos) y han demostrado que las vacunas de ácidos nucleicos pueden producir una fuerte respuesta humoral con la producción de anticuerpos neutralizantes contra el antígeno presente en la vacuna (Finan *et al.*, 1993, Robinson *et al.*, 1993, Ulmer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1993; Bot *et al.*, 1999). Las vacunas de ADN para la influenza proveen efectividad superior contra la cubierta del virus comparado con la vacuna del virus inactivo y se ha observado respuesta inmune protectora cuando los animales inmunizados son retados con una dosis letal del virus. Además, se ha observado disminución de morbilidad y títulos víricos pulmonares reducidos para cepas heterólogas y homólogas del virus de la influenza (Ulmer *et al.*, 1993). Wolff *et al.* (1992) estudiaron la persistencia de la vacuna a largo plazo controlando la expresión proteica y la presencia de ADN plasmídico, y demostraron que las vacunas de ácidos nucleicos pueden persistir en animales vacunados hasta diecinueve meses después de la administración de la vacuna. Se ha observado que los ratones vacunados con una vacuna de ácidos nucleicos continúan expresando altos títulos de anticuerpos durante un año sin disminución de los mismos (Rhodes *et al.*, 1993). Estas vacunas también tienen la capacidad única de expresar más de un antígeno a partir de un único gen, presumiblemente debido al procesamiento alternativo del ARN mensajero.

La inoculación directa de ADN ha demostrado la habilidad de generar respuesta inmune en el hos-

pedero contra una variedad de virus diferentes a la influenza, tanto en animales como en humanos. Se ha observado protección en diferentes modelos de enfermedades virales que afectan a animales, como el herpesvirus bovino, herpesvirus equino, virus de la diarrea bovina, virus de la enfermedad de pies y boca, virus de la pseudorabia y virus de la rabia, entre otros (Braun *et al.*, 1999; Gerds *et al.*, 1999; Harpin *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Ruitenberg *et al.*, 1999; Lodmell *et al.*, 2000). Los virus que afectan a humanos y para los que se ha descrito vacunación por ADN eficaz son, entre otros, citomegalovirus, virus de las hepatitis B y C, herpesvirus, VIH, virus de la rabia y papilomavirus (Hwang *et al.*, 1999; Osorio *et al.*, 1999; Arichi *et al.*, 2000; Davis *et al.*, 2000; Gebhard *et al.*, 2000; Kaneko *et al.*, 2000; Matsumoto *et al.*, 2000). Los resultados con la vacuna de ADN del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, indican que este método puede ser efectivo en individuos que no responden a las vacunas convencionales, y en los portadores crónicos del virus (Kucerova, 1998).

Asimismo, la inyección de ADN plasmídico es una manera efectiva de expresar proteínas bacteriales *in situ* y de inducir protección en modelos animales. Se ha logrado inducir protección contra enfermedades bacterianas vacunando con los genes que codifican para antígenos de *Mycoplasma pulmonis* y *Mycobacterium tuberculosis*, entre otros, y su protección fue medida como reducción en el título de bacterias en los pulmones (Lowrie *et al.*, 1999; Donnelly *et al.*, 1997). Las vacunas de ADN también se han utilizado para crear inmunidad protectora contra parásitos, como *Leishmania major*, *Plasmodium yoelii*, *P. vivax* y *P. falciparum*, los causantes de leishmaniosis y malaria, respectivamente (Belperron *et al.*, 1999; Piedrafita *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la protección contra *P. yoelii* requiere LTC CD8+, los cuales son activados por las vacunas de ADN de forma específica (Falo, 1999). Por otra parte, se cree que las vacunas de ADN serán un modo ventajoso de vacunación adecuado también para neonatos, ya que no se han ob-

servado diferencias entre la inmunización en ratones inoculados a las veinticuatro horas después del nacimiento y ratones adultos (Wang *et al.*, 1997).

Por último, la utilidad de las vacunas de ADN también se ha extendido a las enfermedades no infecciosas, como el cáncer de ovario, de mama, de próstata, linfoma, melanoma y neuroblastoma, entre otros (Bronte *et al.*, 2000; de Zoeten *et al.*, 1999; Neglia *et al.*, 1999; Syrengelas y Levy, 1999; Carpentier *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 1998). Asimismo se ha descrito protección ante enfermedades autoinmunes y alérgicas (Raz *et al.*, 1996; Roy *et al.*, 1999). Respuesta inmune dirigida hacia neoantígenos expresados por las células transformadas *in vivo* (células tumorales) puede ser un blanco factible para las vacunas basadas en ADN. Por ejemplo, la inyección en ratones de ADN que codifica para el antígeno carcinoembriogénico humano, un antígeno expresado en las células tumorales, generó respuesta

inmune humoral y mediada por células contra el antígeno y mostró capacidad para inmunoprotección y terapia (Conry *et al.*, 1994).

Además, ya han entrado en pruebas clínicas en humanos varias vacunas de ADN, las cuales preliminarmente exhiben buena tolerancia (tabla 1). Nótese que en sólo nueve años se ha pasado de la investigación a la clínica experimental. En la actualidad se están realizando estudios clínicos contra VIH (de carácter terapéutico y profiláctico), malaria, hepatitis B y cáncer. A juzgar por los resultados, parece que la técnica ofrece ventajas sobre otras estrategias de vacunación.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS

Quizás la ventaja más apreciada por los científicos es la naturaleza de la respuesta inmune producida por la vacunación por ácidos nucleicos. Si se escogen los genes apropiados, la respuesta es poderosa, duradera (hasta veinticuatro meses

Tabla 1. Resultados de las pruebas clínicas con vacunas de ADN realizadas hasta el momento

Patógeno	Antígenos ^a	Resultados ^b	Referencias
Virus de la inmunodeficiencia humana-1	Env y Rev	Fase I con individuos sero-negativos. Las seis personas que recibieron dosis de 300 µg tuvieron respuestas proliferativas de linfocitos específicos y producción de IFN-γ y β-quemoquina específica	Boyer <i>et al.</i> (2000) <i>J Infect Dis</i> 181:476-483
	Env y Rev	Se observaron cambios en la actividad de los LTC contra los blancos portadores de gp160. Es de destacar que la actividad proliferativa específica de linfocitos contra la cubierta de VIH-1 aumentó en varios pacientes. 3/3 pacientes del grupo de 300 µg de dosis tenían niveles aumentados de MIP-1 alfa, que fueron detectados en su suero	Boyer <i>et al.</i> (1999) <i>Clin Immunol</i> 90:100-107
	Env y Rev	Perfil bueno de seguridad. Se demostró potenciación inmunológica. Fase I	Ugen <i>et al.</i> (1998) <i>Vaccine</i> 16: 1.818-1.821
	Env y Rev	No se detectaron reacciones sistémicas locales ni anomalías en el laboratorio. Ningún paciente desarrolló anticuerpos anti-ADN o elevaciones de los enzimas musculares. No hubo cambios consistentes en el número de linfocitos CD4 o CD8 ni en la concentración de VIH en el plasma. Se observó aumento de anticuerpos contra gp120 en pacientes individuales de los grupos de 100 y 300 µg. También se observó aumento de la actividad de los LTC contra los blancos portadores de gp160 y en la actividad de proliferación de linfocitos	MacGregor <i>et al.</i> (2000) <i>J Infect Dis</i> 181:406. MacGregor <i>et al.</i> (1998) <i>J Infect Dis</i> 178:92-100

Tabla 1. (continuación)

	nef, rev, o genes reguladores tat	Cambios significativos en las cargas virales y en el conteaje de CD4+. Aumento en los niveles de células precursoras de LTC. Respuestas con anticuerpos de baja magnitud. Se indujeron células de memoria detectables en todos los pacientes y citotoxicidad específica en ocho pacientes. Los LTC eran restringidos de CMH clase I y principalmente de origen CD8+	Calarota <i>et al.</i> (1999) <i>J Immunol</i> 163: 2.330-2.338. Calarota <i>et al.</i> (1998) <i>Lancet</i> 351:1.320-1.325
Hepatitis B	CpG DNA(TM)	Fase I	17 de abril, 1999 CpG <i>Immuno-Pharmaceuticals</i> ^e
	Antígeno de superficie	Fase I. Respuesta inmune protectora. Respuesta de refuerzo pero no respuesta inmune primaria	Tacket <i>et al.</i> (1999) <i>Vaccine</i> 17:2.826-2.829
Malaria	Proteína del circumsporozoíto de <i>Plasmodium falciparum</i> (PfCSP)	Fase I. Excelente respuesta de linfocitos T citotóxicos. No hay anticuerpos específicos de antígeno	Le <i>et al.</i> (2000) <i>Vaccine</i> 18: 1.893-1.901
	PfCSP	La primera demostración de inducción de LTC CD8+ en humanos sanos por vacunas de ADN, incluyendo los LTC que eran restringidos a alelos HLA en el mismo individuo. La vacuna era bien tolerada y segura	Wang <i>et al.</i> (1998) <i>Science</i> 282:476-480
Cáncer cervical	Vacuna del papillo mavirus humano para el cáncer cervical	Se están desarrollando estrategias de vacunas HPV terapéuticas y profilácticas	Murakami <i>et al.</i> (1999) <i>J Immunother</i> 22:212-218
Linfoma	nd	En curso	16 de marzo, 1999 Bioject ^e
Linfoma de células B	Vaxid	En curso. Fase I/II	Vical & Universidad de Stanford ^d
Non-Hodgkin's linfoma	nd	En curso. Fase I/II	Junio, 1998 Universidad de Southampton ^e
Carcinoma de células escamosas del cuello y cabeza	Interferón-alfa (IFN- α)	En curso. Fase I/II	16 de marzo, 1999 <i>Gene Medicine Inc</i> ^e
	HLA-B7	En curso Fase II	Vical ^d

^a nd, no determinado.

^b Fase I, número pequeño de pacientes o de voluntarios sanos para determinar perfil de seguridad, patrón de distribución, metabolismo y evidencia temprana de su eficacia. Fase II, gran número de pacientes con la enfermedad para determinar la eficacia preliminar, las dosis óptimas y la evidencia expandida de seguridad. Fase III, a gran escala, en varios centros comparativos con pacientes con la enfermedad para tener datos de seguridad, eficacia y potencia.

^c <http://www.Dnavaccine.com>.

^d <http://www.vical.com>.

en ratones), específica a nivel submolecular (ya que se dirige a los fragmentos de los antígenos, los epítopes), ampliamente protectora contra diferentes cepas de patógenos y, lo mejor de todo, global, implicando anticuerpos y células T, parti-

cularmente las tan demandadas células T citotóxicas (Maurice, 1995).

La vacunación de ADN tiene muchos de los beneficios de las vacunas atenuadas vivas, más al-

gunas ventajas adicionales, como la fácil construcción de las moléculas de ADN recombinante que expresan los genes de interés. Ciertamente, los genes utilizados para transformar células no requieren los métodos de síntesis proteica y purificación tan complicados y costosos, como las denominadas vacunas de subunidades usando fragmentos moleculares de los patógenos (Maurice, 1995). Las vacunas de ADN pueden ser inyectadas intramuscularmente en una solución acuosa simple, que no sólo facilita su administración sino que también puede simplificar el análisis subsiguiente.

Una ventaja adicional de la vacunación por ADN purificado sobre los sistemas portadores de virus es que sólo los genes codificantes para las regiones antigénicas críticas para la inmunidad protectora son transferidos, obviando la necesidad de usar un organismo portador más complejo con su propio material genético abundante y evitando el impacto que supondría en la eficacia de la vacuna la inmunidad al organismo portador. No se utiliza en la producción ningún patógeno que pueda causar enfermedades. Las vacunas de ADN eliminan la posibilidad de que se revierta a una forma más patogénica o que en la preparación de la vacuna queden algunos microorganismos que no estén muertos.

Por otra parte, las vacunas de ADN permiten la presentación de antígenos virales o parasitarios al sistema inmune en una forma nativa, sintetizados por el hospedero en una forma similar a la manera en que los antígenos son sintetizados durante la infección con el patógeno de interés. Los antígenos sintetizados a partir de material genético inyectado directamente dentro de las células hospederas, son dirigidos a las vías asociadas a clase I y II del CMH de la misma manera que los antígenos virales durante la infección, y son por tanto capaces de producir una respuesta inmune celular similar (Tighe *et al.*, 1998). Esto representa la mayor ventaja sobre el uso de antígenos proteicos purificados derivados de recombinantes, especialmente en los muchos casos en los que se ha probado que es difícil o imposible

producir un antígeno complejo viral o parasitario en una forma nativa utilizando técnicas recombinantes tradicionales *in vitro*.

La producción de las vacunas de ADN es más fácil que la producción de las vacunas regulares. Los plásmidos son insertados en bacterias no patogénicas para la producción en masa en tanques de fermentación. Los plásmidos son posteriormente purificados de las bacterias y administrados al animal. El costo de producir ADN plasmídico en bacterias es relativamente bajo comparado con el costo de producir agentes infecciosos usados para la producción de vacunas convencionales (Beard y Mason, 1998). Una vez producido, las preparaciones de ADN son estables a temperatura ambiente, lo que hace a estas vacunas más simples y más baratas de almacenar que muchas de las usadas en la actualidad. No se requiere el complejo logístico de cadena de frío que se necesita para las vacunas sensibles al calor, como la vacuna oral de la polio y muchas otras, particularmente en los países tropicales (Maurice, 1995). Para los productores puede también ser posible un ahorro significativo en los costos de producción haciendo múltiples vacunas ya que es probable que todas tengan protocolos de producción similares. Si las vacunas de ADN pueden ser desarrolladas contra múltiples agentes, parece posible que puedan ser coadministradas en una dosis única, lo que supone ahorros adicionales a los usuarios (Beard y Mason, 1998).

Este método de vacunación es aplicable a tumores, además de ser eficaz contra agentes infecciosos, porque la respuesta LTC CD8+ es importante para ambos procesos patofisiológicos. Por tanto, la producción de una respuesta inmune contra una proteína crucial para el proceso de transformación puede ser un modo efectivo de protección contra el cáncer o inmunoterapia (Ulmer *et al.*, 1993).

Por último, la expresión del antígeno después de la vacunación de ADN puede persistir un cierto tiempo, lo cual puede promover la inducción de células inmunes de memoria de larga vida.

Pero, ¿cuáles son las desventajas? Al menos se deberían nombrar tres problemas potenciales: (i) la introducción de ADN foráneo en el mamífero hospedero conlleva algunas preocupaciones teóricas de seguridad: ¿el ADN va a integrarse al genoma del hospedero, y, si es así, va a tener efectos nocivos? ¿Se puede producir alguna activación potencial de oncogenes?; (ii) ¿puede existir una inducción de respuesta autoinmune? (tales como anticuerpos anti-ADN); y (iii) ¿se puede inducir tolerancia inmunológica? (p. ej. donde la expresión de un antígeno en el hospedero puede conducir a una falta de respuesta específica a ese antígeno) (Schödel *et al.*, 1994). Hasta ahora ninguno de esos problemas potenciales ha sido reportado después de numerosos experimentos con varias especies animales y en los ensayos clínicos en humanos. Las vacunas de ADN no producen organismos transgénicos. Aunque se está introduciendo ADN foráneo a las células, las pruebas han demostrado que el ADN no se integra al genoma celular. Asimismo, las células que contienen el ADN foráneo son atacadas por el sistema inmune y asesinadas normalmente. En cuanto a la posibilidad de que el ADN por sí mismo desencadene una respuesta inmune o autoinmune, parece estar descartado ya que, por sí solo, es un

mal inmunógeno. Sin embargo, las vacunas de ADN deben ser probadas durante más tiempo para ver sus efectos *in vivo* a largo plazo.

Como parece probable que las vacunas de ADN no suponen ninguna amenaza especial a los animales jóvenes o inmunocomprometidos y que su inmunogenicidad no se verá disminuida por los anticuerpos maternos, su futura administración puede ser viable. La vacunación de ADN también está siendo desarrollada para el uso en producción animal comercial, con énfasis en enfermedades virales, que causan grandes pérdidas económicas. Las vacunas de ADN son una gran promesa para evitar enfermedades en animales destinados a la alimentación humana, especialmente en áreas donde los patógenos han eludido las vacunas tradicionales o la intervención terapéutica (Beard y Mason, 1998).

La técnica de la vacunación con ADN es un tema de interés creciente, no sólo por la novedad y la simplicidad de diseño y producción, sino también por su eficacia en proteger animales y seres humanos contra enfermedades infecciosas y su aparente aplicabilidad general a distintos tipos de patologías humanas, incluyendo cáncer y alergias.

REFERENCIAS

- Arichi T, Saito T, Major ME, Belyakov IM, Shirai M, Engelhard VH, Feinstone SM, Berzofsky JA. 2000. Prophylactic DNA vaccine for hepatitis C virus (HCV) infection: HCV-specific cytotoxic T lymphocyte induction and protection from HCV-recombinant vaccinia infection in an HLA-A2.1 transgenic mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 297-302.
- Beard CW, Mason PW. 1998. Out on the farm with DNA vaccines. *Nature Biotechnol* 16:1.325-1.328.
- Belperron AA, Feltquate D, Fox BA, Horil T, Bzik DJ. 1999. Immune responses induced by gene gun or intramuscular injection of DNA vaccines that express immunogenic regions of the serine repeat antigen from *Plasmodium falciparum*. *Infect Immunol* 67:5.163-5.169.
- Bot A, Shearer M, Bot S, Woods C, Limmer J, Kennedy R, Casares S, Bona C. 1999. Induction of antibody response by DNA immunization of newborn baboons against influenza virus. *Viral Immunol* 12:91-96.
- Braun RP, Babiuk LA, Oler BI, Van Drunen Littel-van den H. 1999. Particle-mediated DNA immunization of cattle confers long-lasting immunity against bovine herpesvirus-1. *Virology* 265:46-56.
- Bronte V, Apolloni E, Ronca R, Zamboni P, Overwijk WW, Surman DR, Restifo NP, Zanovello P. 2000. Genetic vaccination with «self» tyrosinase-related protein 2 causes melanoma eradication but not vitiligo. *Cancer Res* 60:253-258.
- Carpentier AF, Rosenfeld MR, Delattre JY, Whalen RG, Posner JB, Dalmau J. 1998. DNA vaccination with HuD inhibits growth of a neuroblastoma in mice. *Clin Cancer Res* 4:2.819-2.824.
- Conry RM, Lobuglio AF, Kantor J, Schlom J, Lowchel F, Moore SE, Sumarel LA, Barlow DL, Abrams S, Curiel DT. 1994. Immune response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. *Cancer Res* 54:1.164-1.168.
- Davis HL, Suparto II, Weeratna RR, Jumintarto, Iskandriati DD, Chamzah SS, Ma'ruf AA, Nente CC, Pawitri DD, Krieg AM, Heriyanto, Smits W, Sajuthi DD. 2000. CpG DNA overcomes hyporesponsiveness to hepatitis B vaccine in orangutans. *Vaccine* 18:1.920-1.924.
- De Zoeten E, Carr-Brendel V, Markovic D, Taylor-Papadimitriou J, Cohen EP. 1999. Treatment of breast

- cancer with fibroblasts transfected with DNA from breast cancer cells. *J Immunol* 162:6.934-6.941.
- Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. 1997. DNA vaccines. *Ann Rev Immunol* 15:617-648.
- Falo LD Jr. 1999. Targeting the skin for genetic immunization. *Proc Assoc Am Physicians* 111:211-219.
- Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:11.478-11.482.
- Gebhard JR, Zhu J, Cao X, Minnick J, Araneo AB. 2000. DNA immunization utilizing a herpes simplex virus type 2 myogenic DNA vaccine protects mice from mortality and prevents genital herpes. *Vaccine* 18:1.837-1.846.
- Gerds V, Jons A, Mettenleiter TC. 1999. Potency of an experimental DNA vaccine against Aujeszky's disease in pigs. *Vet Microbiol* 66:1-13.
- Harpin S, Hurlley DJ, Mbikay M, Talbot B, Elazhary Y. 1999. Vaccination of cattle with a DNA plasmid encoding the bovine viral diarrhoea virus major glycoprotein E2. *J Gen Virol* 80:3.137-3.144.
- Huang H, Yang Z, Xu Q, Sheng Z, Xie Y, Yan W, You Y, Sun L, Zheng Z. 1999. Recombinant fusion protein and DNA vaccines against foot and mouth disease virus infection in guinea pig and swine. *Viral Immunol* 12:1-3.
- Hwang ES, Kwon KB, Park JW, Kim DJ, Park CG, Cha CY. 1999. Induction of neutralizing antibody against human cytomegalovirus (HCMV) with DNA-mediated immunization of HCMV glycoprotein B in mice. *Microbiol Immunol* 43:307-310.
- Kaneko H, Bednarek I, Wierzbicki A, Kiszka I, Dmochowski M, Wasik TJ, Kaneko Y, Kozbor D. 2000. Oral DNA vaccination promotes mucosal and systemic immune responses to HIV envelope glycoprotein. *Virology* 267:8-16.
- Kim JJ, Trivedi NN, Wilson DM, Mahalingam S, Morrison L, Tsai A, Chattergoon MA, Dang K, Patel M, Ahn L, Boyer JD, Chalian AA, Schoemaker H, Kieber-Emmons T, Agadjanyan MA, Weiner DB. 1998. Molecular and immunological analysis of genetic prostate specific antigen (PSA) vaccine. *Oncogene* 17:3.125-3.135.
- Kucerova L. 1998. DNA/Genetic vaccination (minireview). *Viral Immunol* 11:55-63.
- Lodmell DL, Ray NB, Ulrich JT, Ewalt LC. 2000. DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route of vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MPL). *Vaccine* 18:1.059-1.066.
- Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VL, Lima VM, Faccioli LH, Stavropoulos E, Colston MJ, Hewinson RG, Moelling K, Silva CL. 1999. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 400:269-271.
- Matsumoto K, Kawana K, Yoshikawa H, Taketani Y, Yoshiike K, Kanda T. 2000. DNA vaccination of mice with plasmid expressing human papillomavirus 6 major capsid protein L1 elicits type-specific antibodies neutralizing pseudovirions constructed in vitro. *J Med Virol* 60:200-204.
- Maurice J. 1995. Gene vaccines. *Mol Med Today* 2:64-71.
- Neglia F, Orengo AM, Cilli M, Meazza R, Tomassetti A, Canevari S, Melani C, Colombo MP, Ferrini S. 1999. DNA vaccination against the ovarian carcinoma-associated antigen folate receptor alpha (FRalpha) induces cytotoxic T lymphocyte and antibody responses in mice. *Cancer Gene Ther* 6:349-357.
- Osorio JE, Tomlinson CC, Frank RS, Haanes EJ, Rushlow K, Haynes JR, Stinchcomb DT. 1999. Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* 17:1.109-1.116.
- Piedrafita D, Xu D, Hunter D, Harrison RA, Liew FY. 1999. Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. *J Immunol* 163:1.467-1.472.
- Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. 1996. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5.141-5.145.
- Rhodes GH, Dwarki VJ, Abai AM, Felgner J, Felgner PL, Gromkowski SH, Parker SE. 1993. Injection of expression vectors containing viral genes induces cellular, humoral, and protective immunity. *En: Vaccines*. NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, pp 137-141.
- Robinson HL, Hunt LA, Webster RG. 1993. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a hemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 11:957-960.
- Roy K, Mao HQ, Huang SK, Leong KW. 1999. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 5:387-391.
- Ruitenbergh KM, Walker C, Wellington JE, Love DN, Whalley JM. 1999. Potential of DNA-mediated vaccination for equine herpesvirus 1. *Vet Microbiol* 68:35-48.
- Schödel F, Aguado MT, Lambert PH. 1994. Introduction: nucleic acid vaccines. WHO, Geneva, 17-18 May 1994. *Vaccine* 12:1.491-1.492.
- Seder RA, Gurunathan S. 1999. DNA vaccines. Designer vaccines for the 21st century. *New Engl J Med* 341:277-278.
- Syrengeas AD, Levy R. 1999. DNA vaccination against the idiotype of a murine B cell lymphoma: mechanism of tumor protection. *J Immunol* 162:4.790-4.795.
- Tighe H, Corr M, Roman M, Raz E. 1998. Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint. *Immunol Today* 19:89-97.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Howe LA, Leander KR, Martinez D, Perry HC, Shiver JW, Montgomery DL, Liu MA. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259:1.745-1.749.
- Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. 1996. DNA vaccines promising: a new approach to inducing protective immunity. *ASM News* 62:476-479.
- Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dang K, Refaelli Y, Sato AI, Boyer J, Williams WV, Welner DB. 1993. Gene inoculation generates responses against immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4.156-4.160.
- Wang Y, Xiang Z, Pasquari S, Ertl HCJ. 1997. Immune response to neonatal genetic immunization. *Virology* 228:278-284.
- Wang R, Doolan DL, Le TP, Hedstrom RC, Coonan KM, Charoenvit Y, Jones TR, Hobart P, Margalith M, Ng J,

Weiss WR, Sedegah M, de Taisne C, Norman JA, Hoffman SL. 1998. Induction of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in humans by a malaria DNA vaccine. *Science* 282:476-480.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1.465-1.468.

Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A. 1992. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Genet* 1:363-369.

Zhou X, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Jondal M, Liljestrom P. 1994. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine* 12:1.510-1.514.