

ARTICULOS ORIGINALES

Vacunas de DNA

JOHN J DONNELLY, JEFFREY B ULMER, JOHN W SHIVER AND MARGARET A LIU.
DEPARTAMENTO DE VIRUS Y BIOLOGÍA CELULAR, LABORATORIOS DE INVESTIGACIÓN MERCK,
WEST POINT, PENNSYLVANIA 19486

Traducido por Guillermo Restrepo, MV.
Grupo BIOGENESIS, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.
Con autorización de Annual Review of Immunology.
Vol 15, copyright 1997, by Annual Reviews Inc.

Resumen

Las observaciones de comienzos de los años 90 en el sentido de que el DNA de plásmidos podía, directamente, transfectar células animales in vivo, iniciaron la exploración del uso de plásmidos DNA para inducir respuestas inmunes en animales por la inyección directa del DNA. Este método denominado inmunización con DNA, está siendo usado ahora para inducir anticuerpos protectores y respuestas inmunes mediadas por células en una amplia variedad de modelos animales preclínicos para enfermedades virales, bacteriales y parasitarias. La vacunación con DNA es útil particularmente en la inducción de células T-citotóxicas. Esta revisión resume el conocimiento actual sobre los vectores, las respuestas inmunes, los mecanismos inmunológicos y el potencial para las aplicaciones futuras de este novedoso método de inmunización.

Palabras claves:

inmunización, anticuerpos, virus, bacterias, parásitos,
inmunidad mediada por células, inmunidad protectora

Introducción

Las vacunas de DNA representan un nuevo método de expresión de antígenos in vivo para la generación de respuesta inmune humoral y celular. Estas vacunas también han estimulado inmunidad protectora en numerosos modelos preclínicos de enfermedades. Las vacunas de DNA emplean genes que codifican para proteínas de patógenos o de tumores, en lugar de las proteínas mismas, un vector vivo replicativo o una versión atenuada del patógeno. Las vacunas de DNA consisten de un plásmido bacterial con un promotor viral fuerte, el gen de interés y una secuencia de poliadenilación/terminación transcripcional. El plásmido es multiplicado en una bacteria (*E. coli*), purificado, disuelto en una solución salina y posteriormente inyectado. El plásmido DNA es tomado por células del individuo inoculado, en las cuales se produce la proteína respectiva. El plásmido es hecho sin un origen de replicación que sea funcional en células eucarióticas; tales plásmidos no se replican en mamíferos ni se integran en el DNA cromosomal. El papel de las células presentadoras de antígeno (APC) en las respuestas inmunes que suceden después de la expresión de la proteína foránea ha sido estudiado en la inmunización

intramuscular (i.m.) donde las células musculares son el tipo de células primarias que expresan la proteína (ver sección sobre los Mecanismos de Respuestas Inmunes), pero no para otras rutas tales como las que emplean una «pistola de genes» para introducir esferas de oro cubiertas con DNA en la epidermis.

En la demostración inicial de la eficacia protectora de una vacuna de DNA en un modelo animal, los ratones inmunizados con DNA que codifica para una proteína interna conservada de influenza A, la nucleoproteína (NP), desarrollaron anticuerpos NP-específicos y CTL restringida por MHC clase I (1). Mediante re-estimulación mitogénica o antígeno-específica, in vitro, los CTL fueron capaces de lisar células blanco que estaban infectadas con virus o habían sido pulsadas con el péptido restringido por MHC clase I (1). El desarrollo de CTL fue sorprendente porque demostró el poder de esta tecnología para estimular CTL restringida por MHC clase I de manera simple, y permitió la generación de proteínas enteras (en lugar de péptidos), posibilitando que ocurra la selección de determinantes por parte del sistema inmune del individuo. Las vacunas para uso clínico en humanos o en animales, deben ser eficaces frente a un amplio rango de haplotipos MHC. La provisión de

proteínas que permitan que ocurra la selección de determinantes, en lugar de un número limitado de péptidos, sería ventajoso. Aun más, la CTL inducida fue claramente funcional *in vivo*, puesto que los ratones inmunizados con DNA de NP fueron protegidos significativamente frente a una cepa heteróloga (Figura 1) en la cual, los antígenos superficiales de la cepa de descarga diferían grandemente de aquellos de la cepa de la cual fue clonado el gen NP (1,2). (El gen NP fue clonado de una cepa de influenza, que además de ser un subtipo diferente (H1N1 vs H3N2), había sido aislada 34 años antes de la cepa de descarga). Ni la inmunización con NP recombinante ni la

transferencia pasiva de anticuerpos NP-específicos produjeron protección cruzada bajo estas condiciones. En contraste, las respuestas celulares fueron protectoras (ver sección sobre Células Efectoras). Las vacunas de DNA son una alternativa simple a otros métodos para generar CTL, como son, la inmunización con péptidos (los cuales pueden ser limitados en su aplicabilidad a poblaciones genéticamente diversas) o virus vivos atenuados (los cuales en ciertos casos, por ejemplo vaccinia o VIH, pueden tener un uso restringido debido a la preocupación sobre su seguridad).

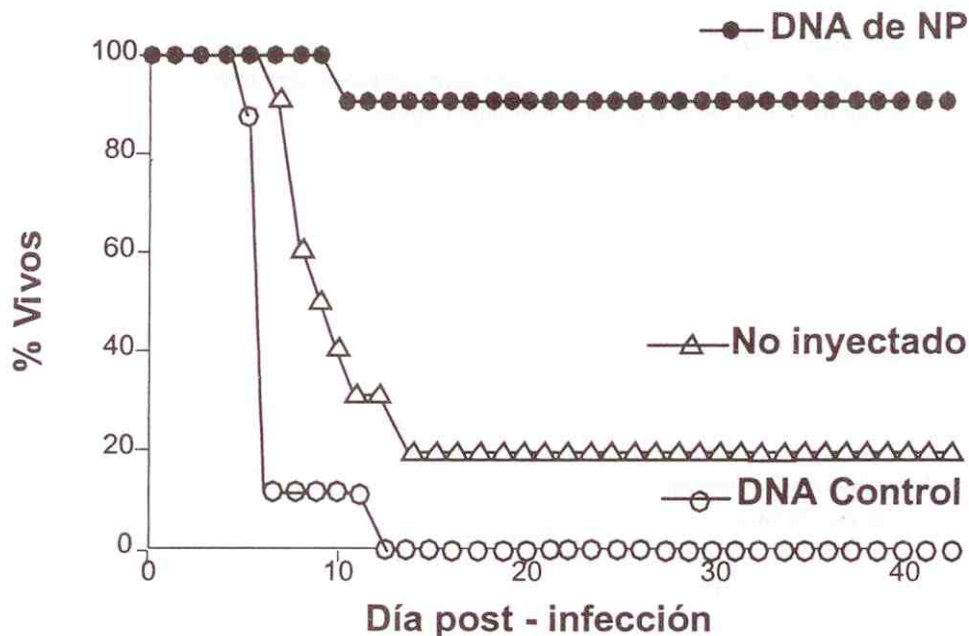


Figura 1

Supervivencia de ratones inmunizados con 200 μ g de DNA de plásmido que codificaba para NP de influenza A/PR/8/34 (H1N1) o con DNA control (plásmido sin región codificadora) o no infectados. Grupos de 10 ratones fueron inyectados tres veces a intervalos de tres semanas y luego confrontados *vía intranasal* con una DL90 de influenza A/HK/68 (H3N2), tres semanas después de la tercera inyección. (Tomado de la Referencia 1, reimpreso con permiso de Science). Observe que en este modelo, la protección puede obtenerse con dosis de DNA tan bajas como 1 μ g dadas por tres veces. (Adaptado de *Annual Review of Immunology*).

Igualmente, se demostró que la vacunación intramuscular de ratones con un plásmido DNA que codifica para hemaglutinina (HA), una proteína de influenza A, también genera una respuesta de anticuerpos (2). Se detectaron altos títulos de anticuerpos anti-HA por ELISA y neutralización y los ratones resultaron protegidos frente a la descarga con un aislamiento homólogo de virus de influenza (Figura 2). Debido a que la vacunación con DNA codificante, conduce a la síntesis de proteínas en el hospedador, se podría suponer que la estructura o la

conformación de tal proteína sería similar o idéntica a la proteína tipo silvestre producida por la infección viral. Esto contrasta con las proteínas producidas *in vitro* en sistemas de expresión de recombinantes (las cuales pueden tener modificaciones alternativas post-transcripcionales o conformacionales) o con patógenos inactivados químicamente (en los que las proteínas de superficie pueden estar deformadas).

El gran número de publicaciones que demuestran la eficacia de las vacunas de DNA, en varios modelos preclínicos, que han aparecido desde la demostración

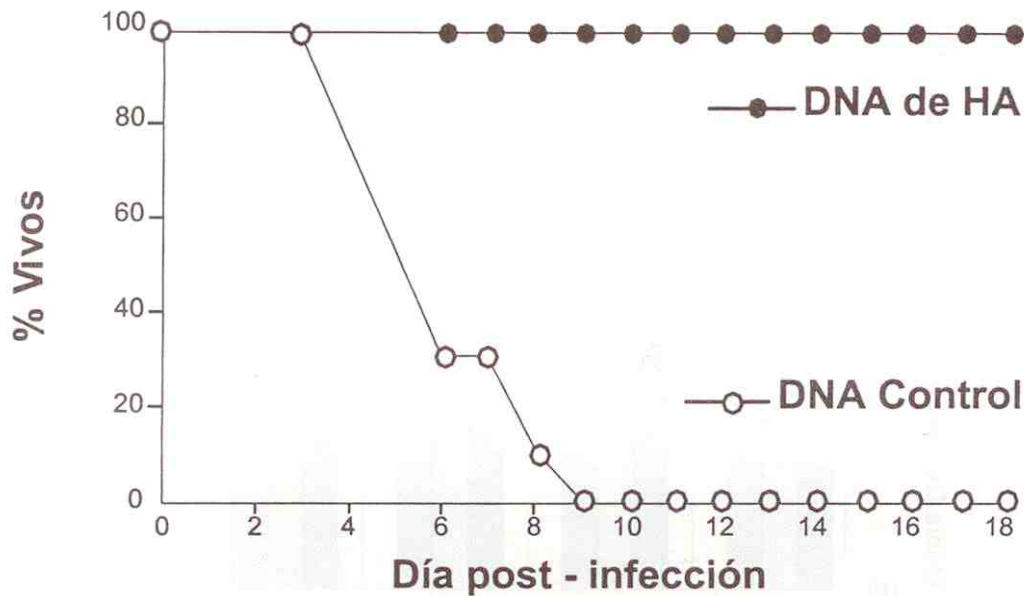


Figura 2

Supervivencia de ratones inmunizados con 200 μg de DNA de plásmido que codifica para HA de influenza A/PR/8/34 (H1N1) o con DNA control (plásmido sin región codificadora). Grupos de 10 ratones fueron inyectados tres veces a intervalos de tres semanas y luego confrontados vía intranasal con una DL_{90} de influenza A/PR/8/34 (H1N1), tres semanas después de la tercera inyección. (Tomado de la Referencia 8, reimpresso con permiso de DNA & Cell Biology.) Obsérvese que en este modelo la protección puede obtenerse con dosis de DNA inferiores a 1 μg , dadas por tres veces (ver Referencia 2). (Adaptado de Annual Review of Immunology).

inicial de la generación de protección eficaz se atribuye tanto a la simplicidad como a la fortaleza de la tecnología. Además de los modelos para enfermedades virales, se ha demostrado la eficacia preclínica o las respuestas inmunes en modelos de enfermedades bacterianas o parasitarias, alergia, tumores y otros antígenos. Aunque el procedimiento más fácil es inyectar el plásmido de DNA vía i.m., se han empleado otros sistemas de administración del DNA, incluyendo la pistola para genes (4,5). Esta última fue desarrollada primero como un método para transfectar células de plantas, pero poco después se demostró que podía usarse para administrar DNA a los animales para la generación de respuestas humorales (4,5). Las diferencias en el método y el sitio de administración del DNA pueden traducirse en diferencias en el carácter de la respuesta inmune (por ejemplo, una respuesta ayudadora tipo-TH1 se produce después de la inyección i.m., pero se observa un cambio a la respuesta ayudadora tipo-TH2 con las vacunaciones sucesivas con la pistola de genes).

Debido a la facilidad de alteración de las construcciones génicas o de mezclar diferentes plásmidos, las vacunas de DNA han sido usadas para explorar el efecto de varias condiciones de vacunación tales como

el uso de diferentes formas de un antígeno (secretado vs unido a membrana), el efecto de diferentes señales intracelulares marcadoras de una proteína y el efecto de citoquinas co-expresadas. Aunque las vacunas de DNA no sufren las complicaciones inmunológicas de un sistema de administración de un vector, en la cual, el vector viral por sí mismo o las proteínas normalmente expresadas por el vector dañan o alteran las respuestas inmunes, las respuestas inmunes resultantes de las vacunas de DNA pueden ser influenciadas por el DNA mismo. Los polinucleótidos han sido reconocidos como inductores de citoquinas y ciertos motivos del DNA bacterial también pueden ser mitogénicos (6). La incorporación de tales motivos en un plásmido parece que aumenta las respuestas de anticuerpos y CTL a una proteína codificada por el mismo o por un plásmido coinyectado (7) cuando los plásmidos son administrados por vía intradérmica. Se ha demostrado que los plásmidos DNA inyectados vía intramuscular aumentan o alteran las respuestas inmunes tanto a una proteína recombinante coinyectada (figura 3A) como a una proteína codificada por un plásmido coinyectado (figura 3B).

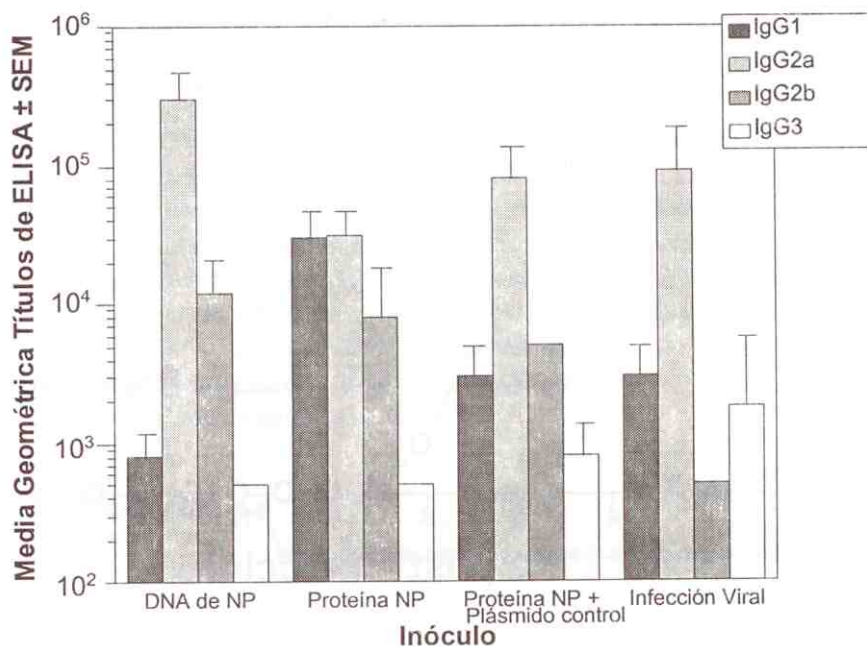


Figura 3 (A).

Alteración de las respuestas de anticuerpos por la co-administración intramuscular de DNA. Los promedios geométricos de los isotipos de los anticuerpos séricos fueron medidos en grupos de 5 ratones inyectados a las 0 y 3 semanas con 100 µg de DNA de plásmido que codificaba para NP de influenza, con 10 µg de proteína NP recombinante purificada o con una mezcla de 10 µg de proteína NP purificada y 100 µg de DNA de plásmido control sin región codificadora o infectados una vez con virus de influenza (A/PR/8/34 (H1N1); 10³ TCID₅₀) por instilación intranasal. Los isotipos anti-NP fueron determinados a la semana 6 por ELISA usando NP recombinante purificada.

(Adaptado de Annual Review of Immunology).

Esta revisión describe el rápido crecimiento en la literatura sobre las respuestas inmunes, la protección en modelos de enfermedades, los mecanismos de las respuestas inmunes y las consideraciones sobre la seguridad de las vacunas de DNA. Esta tecnología ofrece soluciones potenciales a algunos de los desafíos del desarrollo de las vacunas: (a) proporcionando protección más amplia, por ejemplo, contra diferentes cepas de un virus por la generación de respuestas de linfocitos T citotóxicos que reconocen epítopos de proteínas conservadas; (b) presentando el antígeno con modificaciones post-transcripcionales, conformacionales y oligomerización nativas para estimular anticuerpos de óptima especificidad; (c) pro-

veyendo respuestas inmunes de larga duración; (d) estimulando respuestas de células T ayudadoras; (e) facilitando la combinación de diversos inmunógenos en una preparación para facilitar la inmunización simultánea para varias enfermedades. Los ensayos clínicos solo han comenzado recientemente, así que la completa seguridad, la eficacia clínica y la posibilidad de las vacunas de DNA en humanos todavía tienen que ser demostradas. Entretanto, la tecnología ofrece una herramienta de laboratorio para producir reactivos (por ejemplo, anticuerpos), para responder preguntas fundamentales acerca del procesamiento y la presentación del antígeno y las respuestas inmunes del hospedador y para evaluar posibles antígenos.

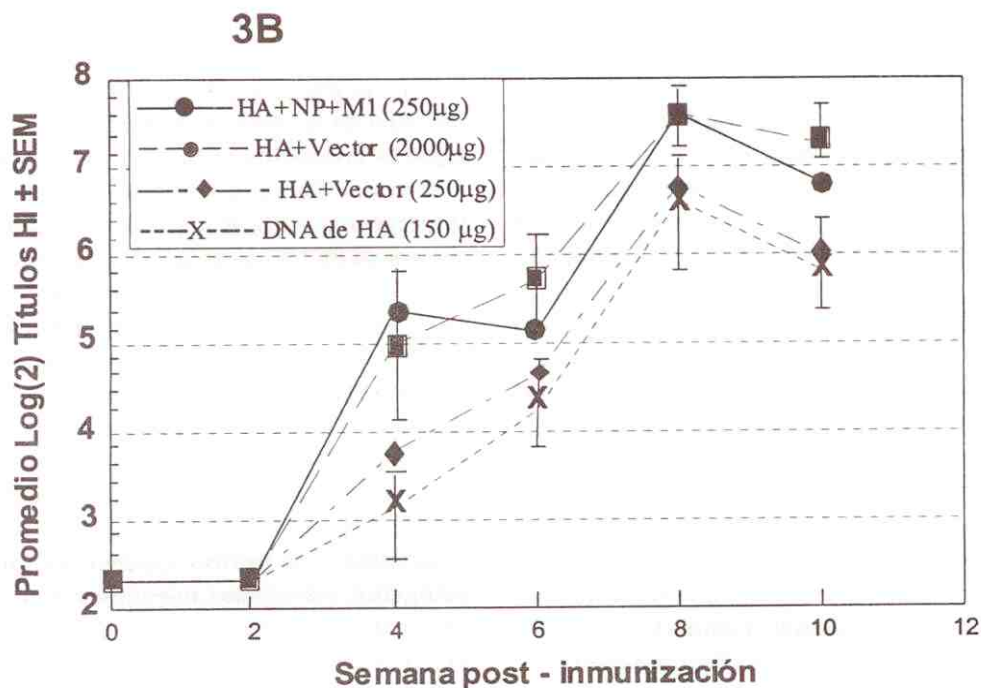


Figura 3 (B)

Promedios del \log_2 de los títulos de anticuerpos séricos inhibidores de la hemaglutinación (HI) \pm SEM de grupos de 6 monos verdes Africanos inyectados a las 0 y 4 semanas con una mezcla de plásmidos DNA. Todos los animales recibieron 50 μ g de cada uno de 3 plásmidos separados que codificaban para HA de tres aislamientos diferentes de influenza: A/Georgia/03/93 (H3N2), A/texas/36/91 (H1N1) y B/Panamá/45/90. En los grupos indicados, 50 μ g adicionales de cada uno de 2 plásmidos DNA que codificaban para la NP y M1 de A/Beijin/353/89 (H3N2), ó 100 μ g ó 1850 μ g adicionales del plásmido control sin región codificadora, fueron agregados a la mezcla. Los títulos HI mostrados fueron obtenidos contra A/Georgia/03/93 (H3N2). La comparación de los \log_2 de los títulos de anticuerpos por análisis de varianza de medidas repetidas, presentaron respuestas equivalentes (dos colas $P=0.653$) en animales que recibieron 150 μ g de DNA de HA más 100 μ g de plásmido control sin región codificadora, mientras que los títulos de anticuerpos fueron significativamente mayores en animales que recibieron 150 μ g de DNA de HA más 1850 μ g del vector (una cola $P=0.010$). Por claridad, las barras del error se muestran en dos curvas solamente; las dos curvas de la parte alta son equivalentes estadísticamente (dos colas $P=0.772$). (Adaptado de Annual Review of Immunology).

Descripción de vectores para uso en vacunas

La mayoría de los plásmidos usados con propósitos de vacunación comparten los atributos básicos de los vectores desarrollados para la expresión de genes in vitro en líneas celulares transfectadas. Estos incluyen (a) un origen de replicación (ori) adecuado para producir grandes cantidades del plásmido en *E. coli*, (b) un gene de resistencia a antibiótico para un crecimiento selectivo en *E. coli*, (c) un potenciador/promotor fuerte y una secuencia de terminación/poliadenilación para dirigir la expresión en células de mamífero.

El ori bacterial ColE1 derivado de plásmido utilizado en plásmidos pUC es bien conocido por su capacidad de producir altas concentraciones de

DNA plasmídico. Los plásmidos de vacunas que contienen este ori han producido concentraciones de DNA hasta de 15-30 mg/L en cultivos en frascos con agitación usando un medio nutriente rico (8; JW Shiver, HC Perry, observaciones no publicadas). Los marcadores de selección para antibióticos aseguran que solamente las bacterias que contienen plásmidos se propaguen durante el cultivo. Los elementos reguladores más frecuentemente usados para vacunas de DNA son los que se conocen como mediadores de altos niveles de expresión de genes bajo condiciones de cultivo de células de mamífero o en ratones transgénicos. Estos incluyen el promotor inmediato/temprano del citomegalovirus humano (pCMVIE) (9),

el promotor LTR del virus del sarcoma de Rous (RSV) (10) y el promotor temprano de SV40 (11) usados en conjunción con el SV40 ó con una secuencia de terminación/poliadenilación de la región 3' no traducida de la hormona del crecimiento bovina (BGH 3'-UTR)(12). Debido a que la expresión de muchos genes de mamífero puede ser dependiente de, o puede ser aumentada por, la inclusión de un intrón, la mayoría de los vectores para vacunas también contienen un intrón. En una serie de experimentos conducidos en nuestro laboratorio, el mejor plásmido para inducir respuestas inmunes utiliza el promotor CMVIE y el intrón A (13) con el BGH 3'-UTR (12), aunque no es probable que una sola construcción sea óptima para todos los genes posibles.

Respuestas inmunes

Respuesta Inmune Humoral

Se ha probado que la administración de DNA plasmídico es un medio efectivo para estimular respuestas humorales inmunes específicas para una lista de proteínas diversas. Las respuestas de anticuerpos inducidas por la vacunación con DNA fueron demostradas contra la hormona del crecimiento humana y la antitripsina humana α -1, por primera vez, en ratones después del bombardeo de partículas de esferas de oro cubiertas con DNA que codificaba para esas proteínas (4). Las proteínas pudieron ser detectadas en el suero durante meses o años, dotando así del potencial de un estímulo continuado de antígeno. Anticuerpos contra las proteínas virales fueron demostrados por primera vez después de la inyección intramuscular de vacunas de DNA que codificaba para NP y HA de influenza (1). Subsecuentemente, otros informes confirmaron la habilidad de la vacunación con DNA para estimular las respuestas inmunes humorales contra NP de influenza (14) y contra otros antígenos de patógenos infecciosos tales como la proteína de la cubierta del HIV (15), la glicoproteína del herpesvirus bovino (16) y el antígeno de superficie de hepatitis B (17). Desde entonces, la administración de DNA que codifica para la glicoproteína de virus de la rabia (18), la proteína de circunsporozoito de *Plasmodium yoelii* (19), el anticuerpo antiidiotípico de un linfoma de células B (20), el antígeno carcinoembrionario (21), la región V de la Ig humana (22), las moléculas MHC clase I (23,24), las glicoproteínas B y D de herpes simplex (25-28), la Rev de HIV (29), la paramiosina de *Schistosoma japonicum* (30), la gp63

de *Leishmania major* (31), la L1 de papilomavirus (32,33), la nucleocápside de virus de hepatitis C (34,35), la proteína del núcleo de hepatitis B (36), la proteína de la cubierta de HTLV-1(37), el prM/E del virus de encefalitis de San Luis (38), el pp65 de tegumento de CMV, la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* (40), el *Mycoplasma pulmonis* (41), los antígenos 85 (42) y hsp65 (39) de *Mycobacterium tuberculosis*, ha resultado en la generación de anticuerpos específicos en modelos animales preclínicos. Así pues, la vacunación con DNA es una forma de amplia aplicación para conseguir la expresión de un antígeno in situ para obtener respuestas inmunes humorales contra proteínas de virus, bacterias, parásitos, tumores y proteínas eucarióticas.

En algunos casos, estos anticuerpos han contribuido a la protección contra el desafío con los patógenos infecciosos relevantes (ver la sección sobre Protección por Vacunas de DNA en Modelos Preclínicos de Enfermedades), lo que indica que los antígenos expresados in vivo, después de la vacunación con DNA, pueden asumir una estructura nativa con epítopes intactos, incluyendo epítopes conformacionales e inducir anticuerpos neutralizantes. Tales anticuerpos han sido demostrados en suero de animales inyectados con DNA que codificaba para la proteína de la envoltura de HIV(15,44,45), glicoproteínas de herpes simples (25-28) y HA de influenza (1,2,46-48). En el caso de la proteína de la envoltura (Env) de HIV, la neutralización fue medida por la habilidad de los anticuerpos para prevenir la formación de sincitio in vitro. Para la HA de influenza, se sustituyó la neutralización por inhibición de la hemaglutinación (HI), la cual detecta los anticuerpos capaces de prevenir la aglutinación de los glóbulos rojos por el virus. Esta técnica es usada, comúnmente, como un indicador de anticuerpos protectores en humanos (49). Debido a que las vacunas de DNA conducen a la expresión del antígeno in situ, la presentación de epítopes antigénicamente importantes al sistema inmune puede ser más eficiente que mediante la inoculación con otros tipos de vacunas, tales como las preparadas con virus inactivados o con subunidades protéicas recombinantes o purificadas. En algunos casos, conseguir la conformación adecuada requiere complejos mecanismos de modificación post-translacional y de desplazamiento intracelular. Como ejemplos, la HA de influenza es transportada eficientemente a la superficie celular solamente como un trímero y la L1 de papilomavirus es una proteína nuclear. Entonces, puede ser algo sorpren-

dente, que la expresión de estas proteínas in vivo después de la vacunación con DNA pueda inducir anticuerpos protectores en animales en la ausencia de expresión de otras proteínas virales.

La duración de las respuestas de anticuerpos inducidas por la vacunación con DNA es de larga vida en ratones, como ha sido demostrado con NP (14,50) y HA (47) de influenza, el antígeno de superficie de hepatitis B (51) y la proteína del núcleo de hepatitis C (35). En algunos primates no humanos, los anticuerpos parecen tener vida más corta (46,52). Sin embargo, esto es cierto también para vacunas con subunidades de proteínas, virus completos o fragmentados y parece que refleja diferencias en la longevidad de la respuesta humoral inmune en estas especies en general (46). Los isotipos de los anticuerpos inducidos son generalmente IgG, pero también se han detectado IgM e IgA séricas (47,48). Se han observado niveles bajos de células formadoras de anticuerpos HA-específicos en el bazo y médula ósea después del bombardeo de ratones con partículas con DNA de HA (47) y la inyección i.m. de DNA de la proteína de circumsporozoito (CSP) de *Plasmodium yoelii* (53). Hasta ahora, pocos o ningún anticuerpo IgA de mucosas ha sido detectado después de la inyección i.m. o bombardeo de partículas de vacunas de DNA. Observaciones preliminares han sugerido que anticuerpos IgA de mucosas pueden ser inducidos por la administración i.m. de complejos DNA/lípidos catiónicos (54) ó la administración oral de DNA encapsulado en microsferas de PLGA (55). Cuando se investigó, la subclase de anticuerpos séricos inducidos por la vacunación con DNA fue predominantemente IgG2a en ratones, sugiriéndose la inducción de una respuesta de células T ayudadoras tipo Th1 (ver sección sobre Respuestas de Células T Ayudadoras). En contraste, la producción de anticuerpos IgE fue inhibida por la vacunación con DNA que codificaba un alérgeno (56) o β -galactosidasa (57), lo que indica que este procedimiento puede ser efectivo para atenuar respuestas alérgicas.

La efectividad de las vacunas de DNA comparada con la de las vacunas convencionales parece favorable. Las vacunas de DNA de influenza, en dosis tan bajas como 10 μ g/construcción en un coctel de DNA (aplicado dos veces), indujo en primates no humanos, títulos HI que fueron comparables o mejores que aquellos inducidos por una dosis completa de vacunas aprobadas para humanos (aplicadas dos veces) (46). Las vacunas de DNA para antígeno de superfi-

cie de hepatitis B (HBsAg) también fueron más efectivas al inducir anticuerpos en ratones, comparadas con proteína recombinante o virus de vaccinia recombinante que expresaba el antígeno (58,59). Aún más, el DNA de HBsAg fue capaz de inducir respuestas humorales fuertes en cepas de ratones poco o no respondedoras.

En muchos casos, podría ser deseable una vacuna combinada de DNA que contenga múltiples plásmidos distintos, que codifiquen para varios antígenos diferentes de un patógeno, para inducir un espectro más amplio de respuestas inmunes. Por ejemplo, para virus que sufren variación antigénica tales como HIV e influenza, puede ser necesario incluir construcciones de DNA que codifiquen para proteínas de superficie de varias cepas diferentes, para proveer protección frente a las cepas que pueden estar circulando. Además, podría ser necesario inducir respuestas de CTL contra unos antígenos y de anticuerpos contra otros. En tales casos, es crítico que la co-inyección de múltiples plásmidos o la co-expresión de múltiples antígenos no resulte en interferencia o competición que conduzcan a enmascarar o a inhibir las respuestas inmunes contra uno de los componentes. Hasta ahora, esto no ha sido examinado detalladamente, pero se ha demostrado que una vacuna combinada que contenga tres componentes diferentes de influenza, es eficaz para la eliminación de virus en hurones y se han demostrado, en primates no humanos, respuestas de anticuerpos contra cada uno de los tres componentes de HA de una vacuna de DNA que contenía siete plásmidos diferentes (46).

Los intentos para aumentar las respuestas inmunes contra antígenos codificados por DNA han incluido la variación del régimen de vacunación con respecto a las dosis y los refuerzos y la co-inyección de plásmidos que codifican para citoquinas o moléculas co-estimuladoras. Como se esperaba, los títulos de anticuerpos son dependientes de la dosis de DNA y del número de vacunaciones. Sin embargo, en algunas especies de animales de laboratorio, esta dependencia se pierde con el tiempo debido a que los títulos de anticuerpos llegan a ser equivalentes, independientemente de las dosis (59) ó del número de inyecciones (48). Las razones para esto no son claras, pero puede ser debido al potencial para que ocurra la expresión del antígeno por un período de tiempo después de la vacunación con DNA. Otros han mostrado que alternando la sensibilización y el refuerzo con una vacuna de DNA que codifica para HA de influenza y una recombinante de viruela aviar que expresa

HA, es más efectivo para inducir anticuerpos contra HA que la vacunación con una u otra por separado (60). La co-expresión de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) con glicoproteína del virus de la rabia (61) o antígeno carcinoembrionario (CEA) (62), resultó en aumento de los títulos de anticuerpos. De manera similar, la co-inyección de DNA que codifica para las moléculas co-estimuladoras B7-1 y B7-2 con DNA que codifica para la hsp65 de *M. tuberculosis* (63) ó CEA (62) indujo títulos de anticuerpos más altos. Resulta muy interesante que, el DNA de interferón γ tuvo un efecto inhibitorio sobre las respuestas de anticuerpos (61). Estos resultados sugieren que este procedimiento puede ser una manera de modulación de la magnitud o tipo de la respuesta inmune inducida por la vacunación con DNA. El plásmido DNA por sí mismo también puede tener propiedades inmuno estimulantes y la administración de DNA adicional o la modificación de la secuencia del DNA puede servir para aumentar las respuestas inmunes (7; vea también la Figura 3 y la sección sobre Efectos Adyuvantes del DNA).

Aparte de la utilidad de la vacunación con DNA para la inducción de anticuerpos protectores y respuestas celulares, se ha demostrado que la técnica de expresión de antígenos in vivo por la administración de DNA es una herramienta valiosa de laboratorio. Por ejemplo, se generaron anticuerpos monoclonales in vivo mediante el bombardeo de partículas de DNA que codifica para la hormona del crecimiento humana (64). Esto ofrece la posibilidad de generar anticuerpos monoclonales sin la necesidad de purificar las proteínas para el inóculo. Las mezclas complejas de antígenos pueden ser seleccionadas por la eficacia inmunogénica o protectora usando inmunización con DNA, mucho más rápido que por purificación de las proteínas componentes individuales (94,141).

Respuestas de Células T Citotóxicas

Linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8⁺, restringidos por CMH clase I, pueden ser demostrados cuando las células de nódulo linfático o de bazo de ratones, que habían sido inyectados vía intramuscular con DNA de plásmidos que codificaban para antígenos virales, fueron re-estimulados in vitro con antígeno, o con mitógeno e IL2, ó en el caso de virus de coriomeningitis linfocítica (LCMV), re-estimulados in vivo por infección viral. Se ha demostrado la CTL

efectora que reconoce epítopes de péptidos propios del elemento de restricción H-2, en ratones inmunizados con DNA que codifica para la NP del virus de la influenza A(1), el antígeno de superficie (HBsAg) (65), el antígeno del núcleo (36) de hepatitis B y Env de HIV (29,66,67) y en primates no humanos inmunizados con DNA que codifica para Env de HIV (68). Fue sorprendente que, la inmunización de ratones H-2^b con un plásmido DNA que codificaba para el HBsAg también indujo una CTL CD8⁺ D^b-restringida que reconocía células RBL5 de linfoma T transfectadas con el gen HBsAg; una CTL de esta especificidad no había sido identificada antes (65). Una CTL que era capaz de reconocer y matar blancos infectados con virus fue demostrada por Ulmer et al (1) contra virus de influenza y por Liu et al (68) y Wang et al (69) mediante el uso de blancos infectados con recombinantes vaccinia-HIVgp160, por Xiang et al(18,70) mediante el uso de virus de vaccinia o glicoproteínas recombinantes de adenovirus-virus de rabia, por Yokoyama et al (71) y Pedroza-Martins et al (72) usando LCMV y por Manickan et al (73) usando HSV. En estudios con NP de influenza en ratones BALB/c, una inyección intramuscular, en dosis tan pequeña como 1 μ g de DNA de NP (2), indujo una CTL que reconocía el péptido del epítipo de los aminoácidos 147-155 de NP de influenza. En otros estudios, se encontró que la CTL anti NP persistía por más de 2 años después de la inmunización con DNA de NP de influenza (14,74,75).

La inducción de respuestas CTL después de la inmunización con pistola de genes fue demostrada por primera vez por Hui et al (76) usando DNA que codificaba para el antígeno MHC H-2K^b, administrado intraesplénica e intramuscularmente después de la exposición quirúrgica de los tejidos. Los ratones inmunizados por esta combinación de rutas desarrollaron CTL aloespecífica. Un procedimiento combinado de inyección intramuscular seguida por inoculación intradérmica con la pistola de genes, fue usado para aumentar el reconocimiento por CTL de un péptido del asa V3 de HIV, así como los anticuerpos neutralizantes y los anticuerpos contra p24 de HIV en ratones (45). Las respuestas CTL de esplenocitos re-estimulados in vitro con el péptido del asa V3 persistieron hasta 15 semanas después de la inmunización final, aunque la respuesta de anticuerpos contra ENV declinó después de la segunda inyección i.m. y continuó declinando hasta niveles no detectables (45). En otros estudios, usando la inmunización con pistola de genes exclusivamente, en ratones que recibie-

ron tres inmunizaciones intradérmicas, cada una de 4 μg de una construcción que codificaba para la gp120 y 1 μg de una construcción que codifica para Rev, se detectaron respuestas CTL después de dos inmunizaciones, pero fueron suprimidas después de la tercera inmunización, mientras que las respuestas de anticuerpos aparecieron solo después de la tercera dosis (77). Los autores sugirieron que la supresión estaba relacionada con un cambio de fenotipo de Th1 a Th2 en células T ayudadoras, puesto que la pérdida de la respuesta CTL era bloqueada por la administración de anticuerpos contra IL-4 (77). Estas observaciones difieren de los estudios en los que se usa inmunización i.m., en los cuales la inmunización repetida y el refuerzo aumentaron las respuestas inmunes mediadas por células contra NP de influenza (75) y Env de HIV (67,78), y en ambos casos la respuesta inmune fue del fenotipo Th1 (53). La inmunización con DNA también indujo respuestas CTL antígeno específicas en primates no humanos. En varios experimentos independientes, todos los monos rhesus (18 en total) inyectados vía intramuscular con plásmidos que codificaban genes de env o gag de HIV desarrollaron CTL Gag- o Env- específica, restringida por MHC clase 1, después de una o dos vacunaciones (68, JW Shiver, Y Yasutomi, resultados no publicados). En estos experimentos, B-LCL autólogos infectados con vaccinia-Env o -Gag fueron usados para restimulación de linfocitos in vitro y como células blanco. La CTL anti Env fue detectada por lo menos durante 11 meses (el tiempo más largo probado) después de la última inyección (de 4 inyecciones) en los 4 monos probados, demostrando que estas respuestas eran duraderas. La inmunización de monos rhesus con pistola de genes, usando plásmidos que codifican los genes Env y Gag de SIV indujo CTL env-específica en 3/3 monos, aunque la CTL gag-específica no fue detectada (79). Las inyecciones intramuscular e intravenosa de los mismos plásmidos, combinadas con inmunización con pistola de genes, produjeron CTL Env-específica en 3/3 animales y CTL Gag-específica en 2/3 (79). Los resultados algo diferentes obtenidos en estos experimentos pueden reflejar diferentes capacidades de estos plásmidos de expresar el antígeno.

En estudios de inmunización con pistola de genes usando DNA que codificaba para NP de LCMV, los precursores CTL NP-específicos fueron inducidos en el bazo de ratones inmunizados con frecuencias de aproximadamente 10^{-5} después de una inmunización y 6×10^{-5} después de 4 inmunizaciones (80). Los

ratones no fueron protegidos de la muerte después de la confrontación intracraneal con LCMV, en contraste con ratones inmunizados vía i.m. con DNA que codificaba para NP de LCMV (71). Estudios comparados de inducción de CTL usando una construcción de NP de influenza, administrada vía epidérmica con la pistola de genes o vía intradérmica por inyección con aguja, indicaron que, para esta construcción en particular, la inyección i.d. de 1 μg de DNA, con una aguja convencional, no inducía CTL, mientras que una cantidad tan pequeña como 16 ng de DNA por inmunización con pistola de genes sí inducía CTL (81). La comparación de respuestas de anticuerpos inducidas por inmunización de ratones vía intramuscular o con pistola de genes, con una construcción que codifica para la alanina amino-transferasa humana, indicó que después de la administración de 16 ng de DNA con la pistola de genes se inducían títulos de anticuerpos más altos que con 1 μg de DNA administrado vía intramuscular (81). Sin embargo, en estos estudios, las inyecciones i.m. fueron administradas por exposición quirúrgica de los músculos cuádriceps, una técnica que en nuestro laboratorio demostró la capacidad para inducir respuestas inmunes rotectoras más bajas que con inyección i.m. a través de la piel intacta (JJ Donnelly, JB Ulmer, C DeWitt, RR Deck, observaciones no publicadas). La administración intradérmica de plásmido DNA usando métodos de inyección con aguja convencional ha sido investigada en nuestro laboratorio y en otras partes (50,82-84). En el caso de NP de influenza, aunque se indujeron respuestas de CTL por este método en ratones (50,84), los estudios de protección, comparando ratones inmunizados vía intramuscular e intradérmica con DNA de NP, sugirieron que el método intradérmico era menos efectivo (84).

Respuesta de Células T Ayudadoras

Las funciones efectoras de los linfocitos T pueden ser realizadas por interacciones entre células o por varias proteínas, particularmente las citoquinas, que secretan las células T después de la activación por el antígeno. Estos mecanismos son utilizados por los linfocitos T para proveer "ayuda" a otras células inmunes, incluyendo macrófagos y linfocitos T y B, que facilitan la diferenciación y el desarrollo de células efectoras y de memoria. Las células T ayudadoras pueden ser agrupadas dentro de subgrupos funcionales caracterizados por las citoquinas que producen (85). En ratones, las citoquinas tales como IL-2 e interferón- γ , producidos por células T ayudadoras

tipo-1 (Th1), soportan el desarrollo de respuestas celulares inmunes, incluyendo CTL, y la inmunoglobulina del isotipo IgG2a; las citoquinas tipo IL-4, IL5, IL-6 e IL10 producidas por células T ayudadoras tipo-2 (Th2) promueven la activación de células B y el cambio de clase de inmunoglobulinas, lo cual se tipifica por predominancia de la inmunoglobulina del isotipo IgG1. Tipos similares de células T ayudadoras han sido caracterizadas en humanos, así como los subgrupos que pueden producir las citoquinas tipo-Th1 y -Th2, demostrando la importancia de los estudios en ratones (86). El tipo de célula T ayudadora estimulada durante la infección por un microorganismo patógeno puede tener un efecto crítico; por ejemplo, la infección por *Leishmania* es letal en cepas de ratones que desarrollan respuestas Th2 a la infección, mientras que aquellas que desarrollan respuestas Th1 se hacen resistentes (87). Es probable que el tipo de célula T ayudadora que estimule una vacuna pueda ser un determinante crítico para la eficacia de la misma.

La inmunización intramuscular con plásmidos DNA que codifican para una variedad de antígenos tales como HA y NP de influenza, *Env*, Gag y Rev de HIV y antígeno 85 de *M. tuberculosis*, genera respuestas de linfocitos T de memoria que se manifiestan por la proliferación de células T antígeno-específicas y secreción de citoquinas durante los cultivos de esplenocitos de individuos vacunados (88). La proliferación de linfocitos de animales inmunes fue entre

3 y 100 veces mayor que las células cultivadas sin antígeno, mientras que la proliferación de los esplenocitos de los cultivos de los controles vacunados fue entre una y tres veces mayor que en los controles. El sobrenadante de estos cultivos contenía altos niveles de IL-2 e interferón- γ , poca o ninguna IL-4 ó IL-5, indicando que estas vacunas de DNA estimularon respuestas de citoquinas del tipo Th-1. La remoción selectiva de poblaciones de linfocitos, en los estudios de NP y Env, indicó que los linfocitos TCD4⁺ fueron las células respondedoras primarias en estos ensayos. Estas respuestas se mantuvieron por lo menos durante un año (máximo tiempo probado) indicando que se habían generado respuestas de memoria de larga duración.

Estos resultados, tomados en conjunto, sugieren que la generación de células T ayudadoras tipo Th-1 puede ser una propiedad general de las vacunas de DNA. Sin embargo, usando una pistola de genes para la vacunación, la cual descarga el DNA sobre la epidermis principalmente, parece que las respuestas inmunes se desvían hacia las respuestas tipo Th-2 (77). Actualmente, no hay información concluyente que explique estas diferencias. Sin embargo es interesante anotar que la inyección intradérmica de DNA de gp120 de HIV también estimula las respuestas tipo Th-1, indicando que el músculo no es el único sitio de inyección que permite la inducción de células ayudadoras de tipo 1 (89).

Protección por vacunas de DNA en modelos preclínicos de enfermedades

Enfermedades virales

Como se describió en la introducción, la influenza fue la primera enfermedad para la cual se demostró inmunidad protectora en modelos animales. Estudios más avanzados ampliaron la demostración de protección a los hurones, en los cuales pudo hacerse una comparación de la eficacia de la protección de las vacunas de DNA y de vacunas aprobadas para uso clínico, usando para el reto cepas de influenza de origen humano (en lugar de cepas adaptadas a ratón) (46). En estos estudios, la inmunización con una mezcla de plásmidos DNA que codificaban para HA y dos de las proteínas internas conservadas (NP y matriz), de un aislamiento de influenza antigénicamente distinto, produjo protección (medida como una disminución de la eliminación de virus

vía nasal) tan buena como la protección conferida por DNA que codificaba para HA homóloga. Aún más, la protección conferida por las vacunas de DNA que codificaban para HA de la cepa inicial, fue significativamente mejor que la protección conferida por la inmunización con una dosis completa de la vacuna aprobada para humanos, que contenía la misma cepa viral. Las respuestas inmunes protectoras han sido demostradas en otros modelos animales preclínicos, incluyendo la influenza en pollos (90) y hurones (46,91), herpes virus bovino (16), modelos murino y de mucosas de cobayos para herpes simplex (25-28), virus de rabia(18), virus de coriomeningitis linfocítica (71,72), virus de papiloma, en conejos cola de algodón (32), y virus de hepatitis B (92). Mientras que la mayoría de los anteriores modelos eran depen-

dientes de la generación de respuestas protectoras de anticuerpos, en los estudios de LCMV y de influenza con DNA de NP (ver la sección sobre Células Efectoras), la protección observada estaba basada en respuestas celulares. En ambos casos, los ratones BALB/c y C57BL/6(B6), inmunizados con DNA que codifica para NP de LCMV, fueron protegidos frente a la descarga letal (71), mientras que solamente los ratones B6 pudieron ser protegidos por inmunización con DNA de glicoproteína (GP). La NP de LCMV contiene epítopes CTL que pueden ser reconocidos por los ratones BALB/c y B6, mientras que la GP de LCMV contiene epítopes restringidos por H-2^b (ratones B6) pero carece de epítopes restringidos por H-2^d para ratones BALB/c (71). Estas observaciones sugieren que la CTL inducida por DNA, contribuye significativamente al efecto protector de DNA de GP contra LCMV en ratones B6.

En las enfermedades en las que la protección era mediada por anticuerpos, la protección observada en el modelo de HSV en cobayos y en el caso del virus de papiloma del conejo cola de algodón (CRPV), que es un modelo del virus de papiloma humano, ilustró puntos claves. La protección contra HSV en el cobayo (27,28) demostró la habilidad de las vacunas de DNA (administradas vía i.m.) para promover protección frente a una enfermedad de las mucosas genitales. Con una vacuna de DNA para CRPV se generaron anticuerpos neutralizantes protectores contra una proteína que era considerada como un candidato pobre para la expresión in vivo (32). El antígeno blanco, la L1, la mayor proteína de la cápside, está normalmente localizada en el núcleo de la célula donde ocurre el ensamble del virus. Los monómeros L1 se asocian en capsómeros pentaméricos y 72 capsómeros forman la cápside viral, contra la cual están dirigidos los anticuerpos neutralizantes (93). Resulta muy interesante que una vacuna de DNA generara la forma apropiada del antígeno, el cual era accesible al sistema inmune humoral.

Enfermedades bacteriales

Una de las ventajas de la aplicación de la tecnología de la vacunación con DNA a las enfermedades virales es que la expresión de las proteínas virales in situ, después de la vacunación con DNA, puede resultar en el doblamiento, la modificación post-translacional y el transporte intracelular adecuados, porque las proteínas virales son expresadas normalmente por las células eucarióticas del hospedero durante el curso de una infección. En contraste, las

proteínas bacteriales son expresadas por el microorganismo y no por la maquinaria de síntesis de proteínas de la célula hospedera. Por lo tanto, la expresión de proteínas bacteriales por células eucarióticas puede conducir a diferentes tipos de modificación post-translacional y puede resultar en una conformación no-nativa. Sin embargo, la inyección de plásmidos DNA es una manera efectiva para expresar proteínas bacteriales in situ (tanto proteínas «reporteras» como antígenos) y también para proveer protección eficaz en modelos animales. Las vacunas de DNA que codificaban para proteínas del patógeno pulmonar *M. pulmonis* confirieron protección (94). En este caso, varios miles de plásmidos diferentes fueron utilizados como coctel de vacunas en una técnica denominada *inmunización por expresión de biblioteca*. Aunque no se conocen los componentes específicos de esta mezcla, responsables de la protección, los resultados indican que por lo menos uno de los plásmidos codificaba un antígeno protector (o una porción de él) de *M. pulmonis*.

Las vacunas de DNA que codifican para antígenos de *M. tuberculosis* también son protectoras en modelos animales. En estudios independientes se demostró la eficacia de DNA que codificaba para los antígenos 85 (42) y hsp65 (43) en ratones, usando modelos de confrontación con *M. tuberculosis* por aerosol y vía sistémica, respectivamente. Es importante notar que la magnitud de la protección inducida por estas vacunas de DNA que codifican para un solo antígeno de *M. tuberculosis*, fue comparable a la inducida por la vacuna de *M. bovis* BCG, medida por la reducción en el título de la micobacteria en los pulmones. Finalmente, una vacuna de DNA que codifica para el fragmento C de la toxina tetánica produjo protección en un modelo animal (95). También se han conseguido respuestas de anticuerpos contra la proteína porina OmpC de *Salmonella typhi* (96). Así pues, las vacunas de DNA para enfermedades bacteriales parecen posible, no dejando de reconocer las inquietudes potenciales de la expresión de proteínas bacteriales en células eucarióticas.

Enfermedades Parasitarias

Las vacunas de DNA también han sido utilizadas para producir inmunidad protectora contra parásitos. Se han producido exitosamente anticuerpos contra las proteínas de un parásito metazoario, el *Schistosoma japonicum* (30) y dos protozoarios, la *Leishmania major* (31, 97) y el *Plasmodium yoelii* (19,53,82,98,99), por inyección intramuscular de

DNA de plásmido. El tipo de respuestas protectoras estimuladas por las vacunas de DNA no están completamente caracterizadas en estos modelos, pero en el caso de *L. major* y *P. yoelii*, es probable que la protección sea del tipo de protección mediada por células. La inmunización de ratones BALB/c con un plásmido que codificaba para la gp63 de *L. major* indujo una respuesta de células T ayudadoras con un fenotipo Th1 dominante (31,97). Los ratones BALB/c son normalmente susceptibles a la infección por *L. major* debido a su incapacidad de producir una respuesta Th1, a menos que se les suministre IL-12 exógena (100), sugiriéndose que la vacunación con DNA provee una manera de superar este déficit. La protección contra *P. yoelii* puede requerir, de manera variable, CTL CD8⁺, INF- γ y óxido nítrico, porque la depleción de alguno de estos efectores anulaba la protección in vivo en este modelo (99). La selección de determinantes por moléculas MHC limita la capacidad de los plásmidos que codifican para proteínas individuales de *P. yoelii*, de proteger diferentes cepas de ratones consanguíneos (99). Una combinación de varias construcciones que codifican diferentes proteínas de malaria han sido usadas para proveer epítopes complementarios de manera que puedan inducirse respuestas inmunes protectoras en una variedad de cepas co-sanguíneas con diferentes haplotipos MHC (99). Se ha encontrado también, que la ruta de administración del DNA afecta las respuestas inmunes generadas contra antígenos de malaria. En estudios en los que se usaron plásmidos que codificaban tres genes diferentes de malaria, el DNA que codificaba para un antígeno hepático y un antígeno de la fase eritrocítica (HEP17) protegió los ratones igualmente bien cuando se administró por vía intradérmica o vía intramuscular, mientras que el DNA que codificaba para la proteína de circumsporozoíto (CSP) o la proteína 2 de superficie del esporozoíto (SSP2) dio mejor protección por la ruta i.m. (82). Al contrario, las respuestas de anticuerpos contra SSP2 en ratones fueron mayores por la vía i.d., mientras que la vía i.m. dio mayores respuestas de anticuerpos para CSP y HEP17 (82). El DNA de plásmido que codifica la CSP indujo respuestas de anticuerpos en monos *Aotus*, solamente cuando se administró por la vía

i.d. (82). Así pues, ninguna ruta es terminantemente favorecida sobre las otras en todos los casos y diferentes sitios anatómicos pueden proveer óptima inmunogenicidad para diferentes proteínas de malaria.

Tumores

La identificación de antígenos relativamente específicos de tumores e información sobre la administración local de las citoquinas adecuadas, las cuales pueden tener beneficio terapéutico en la reducción de tumores establecidos en modelos animales, ha aumentado el interés por desarrollar vacunas antitumorales. Varios laboratorios han informado sobre el uso de plásmidos DNA como vacunas antitumorales usando uno o ambos planteamientos. Se han usado vacunas de DNA que codifican los genes variables (V) de anticuerpos para estimular respuestas de anticuerpos anti-idiotípicos (20,201). Aun más, se han obtenido títulos de anticuerpos relativamente altos con la co-inyección de plásmidos que codifican los genes de IL-2 ó el interferón γ . Este procedimiento puede representar una terapia útil contra linfomas que expresan inmunoglobulinas de superficie, utilizando vacunas preparadas para cada paciente, lo cual debe ser más técnicamente posible que las vacunas de proteína recombinante de una cadena de anticuerpos. Conry et al (102) informaron que la vacunación de ratones con DNA que codificaba para el antígeno carcino-embriónico humano (CEA), el cual es expresado en niveles altos en cáncer de colon, seno y células no pequeñas del pulmón, estimuló respuestas de células T y de anticuerpos CEA-específicos y protegió a los ratones en las confrontaciones subsiguientes con líneas de células singénicas de tumores que expresan CEA. De manera similar, Taylor-Papadimitriou y colaboradores, utilizando DNA de plásmidos que contenían el gen MUC-1, el cual codifica la mucina epitelial pleomórfica (PEM) asociada con cánceres de seno, pancreático y de colon, protegieron a los ratones frente a células singénicas de tumores que expresan PEM (103). Sus experimentos sugirieron que la protección no se correlacionaba con respuestas humorales inmunes aunque la CTL PEM-específica no pudo ser detectada antes de la confrontación con el tumor.

Mecanismos de la inmunidad

Principios generales

La inmunización por transfección directa con DNA ha generado numerosas preguntas con respecto a los mecanismos de inducción de las respuestas inmunes. Puede ser útil considerar las respuestas inmunes inducidas por la inmunización con DNA en el contexto de aquellas respuestas inducidas por la infección viral. Tanto la infección viral como la inmunización por DNA producen antígeno(s) foráneo(s) en células somáticas, por ejemplo en células epiteliales de las vías aéreas en infecciones con influenza, rinovirus o virus respiratorio sincitial, en miocitos después de la inyección i.m. de DNA o en epitelio cutáneo después de la administración de DNA con la pistola de genes (1,4,49). La proporción de las células infectadas en un sitio determinado puede ser relativamente alta en algunas infecciones virales, mientras que un porcentaje relativamente bajo de las células pueden expresar el antígeno después de la transfección directa con DNA de plásmidos. La infección viral puede desencadenar la producción de interferones y alteraciones de regulación de genes dependientes de interferón, dentro de la célula hospedera, para limitar la replicación viral. No se sabe hasta donde la expresión de plásmidos DNA que codifican genes de antígenos virales puedan estimular respuestas fisiológicas similares. Aun más, muchos virus, por ejemplo vaccinia, HSV y CMV, producen proteínas que pueden reducir el reconocimiento inmunológico de las células infectadas, por ejemplo, reduciendo la expresión de moléculas de MHC clase I. La expresión de las proteínas virales individuales, en ausencia de otras, por inmunización con DNA, puede intensificar el reconocimiento inmunológico de las células transfectadas. Se ha demostrado la capacidad del DNA bacterial de activar directamente las células inmunes (6,104) y estos efectos pueden incrementar las respuestas inmunes después de la inyección directa de plásmidos.

La duración de la expresión del antígeno en células somáticas puede variar - desde 2-3 días, hasta que la epidermis es descamada después de la inmunización con la pistola de genes (5) hasta semanas o meses para la expresión de proteínas codificadas en miocitos después de la inyección i.m. de DNA. Existe, pues, un potencial para variaciones en la respuesta inmune debido a las diferencias en la duración de la expresión o la persistencia del antígeno en las células somáticas

en la periferia o en células presentadoras de antígeno en el tejido linfoide.

Vacunas de DNA vs Virus Vivos

El impacto potencial de estos factores puede ser considerado en la comparación de las respuestas inmunes a las infecciones con virus vivo y a la inmunización con DNA. En el caso del virus de influenza, se pueden hacer algunas comparaciones en la misma especie animal. Para la hemaglutinina de influenza en ratones, tanto la infección viva como la inmunización con DNA, indujeron altos títulos de anticuerpos séricos que persistieron por toda la vida del animal (1,2,48). Las respuestas de células T ayudadoras a la infección viva de influenza y a la inyección i.m. de DNA fue generalmente del tipo Th-1. Tanto la infección con virus vivo como la inyección i.m. de DNA indujeron respuestas de CTL y se demostró la protección cruzada en ratones después de la infección viva de influenza o inmunización i.m. con DNA de plásmido que codificaba para NP de influenza (1,2). Las comparaciones de la inmunización i.m. y por pistola de genes, basados en la información publicada, son más complejas porque en general no se han usado construcciones idénticas en los dos métodos. Usando la gp 120 de HIV en ratones, las inmunizaciones repetidas con pistola de genes pueden variar la respuesta de predominantemente tipo Th-1 a predominantemente tipo Th-2 (77). Se han inducido respuestas de anticuerpos IgG, por ejemplo para NP de influenza, pero la duración de estas respuestas no ha sido definida y en algunos estudios, la inmunización repetida con pistola de genes ha reducido las respuestas de anticuerpos (45,77). La protección cruzada no ha sido evaluada en ratones después de la inmunización con pistola de genes con DNA de plásmidos que codificaban para NP de influenza. Entonces, puede ser que la cantidad de DNA de plásmido administrada y el método y el sitio de administración pueden influenciar, significativamente, los tipos de las respuestas inmunes generadas contra las proteínas codificadas por el plásmido.

Células Efectoras

Como se describió en detalle, las vacunas de DNA pueden conferir inmunidad protectora. En algunos casos, los anticuerpos dirigidos contra proteínas de la superficie viral o las respuestas CTL contra los

péptidos de epítopes de proteínas internas son responsables de la protección. Los anticuerpos HI dirigidos contra HA de influenza correlacionan bien con protección en humanos (105). De manera similar, las vacunas de DNA de HA inducen anticuerpos HI y protección en ratones (1,2,8,48) y hurones (46). Adicionalmente, los niveles de anticuerpos HI correlacionaron bien con protección en ratones (48) y la transferencia pasiva de anticuerpos anti-HA protegió a los ratones en confrontaciones subsiguientes con virus (A Friedman, JJ Donnelly, JB Ulmer y MA Liu, observaciones sin publicar). Así pues, los anticuerpos HI inducidos por la vacunación con DNA, confieren protección. Se piensa que los anticuerpos generados por vacunas de DNA que codifica la glicoproteína del virus de la rabia, la glicoproteína del herpesvirus bovino y la L1 de papilomavirus, juegan un papel en la protección en sus respectivos modelos animales.

Varias vacunas de DNA inducen fuertes respuestas CMI, incluyendo la CTL (ver la sección sobre Respuestas de Células T Citotóxicas). En algunos casos, las CTL importantes son células T CD8⁺, como en el caso de CSP de *P. yoelii* (19), nucleoproteína de LCMV(71), nucleoproteína de influenza (1,14,106) y antígeno 85 de *M. tuberculosis* (42). Basados en estudios de depleción in vivo y de transferencia adoptiva de CTL (re-estimulada in vitro con el epítipo restringido-clase I), la protección conferida por inmunización con DNA de NP de influenza fue dependiente de células T CD8⁺ (TM Fu, A Friedman, JB Ulmer, RR Deck, observaciones sin publicar; ver también la introducción y la Ref. 1). En el LCMV, las respuestas CTL también pueden ser responsables de algunos de los síntomas de la enfermedad como una consecuencia del daño del tejido mediado por CTL. Se ha sugerido que, en el caso de LCMV, una respuesta primaria CTL más potente podría ser protectora frente a la descarga (71). En malaria, las células T CD8⁺ también juegan un papel importante en protección (99). Sin embargo, aparentemente en este caso, no es la actividad citolítica sino más bien la secreción de citoquinas lo que confiere protección (99). Específicamente, la secreción de INF- γ des-regulaba la producción de óxido nítrico en células infectadas, lo cual puede limitar el crecimiento de patógenos intracelulares. En la vacunación con DNA en el modelo zosteriforme de herpes simplex en ratón, son las células T CD4⁺ y no las células T CD8⁺ eran las responsables de la protección, como se demuestra por la transferencia adoptiva (25). En otros modelos de herpes (simplex),

los anticuerpos contra gD o gB pueden proveer protección (25,28). Así pues, las vacunas de DNA pueden inducir un amplio rango de respuestas inmunes protectoras, dependiendo del modelo animal en particular.

Procesamiento y Presentación de Antígenos después de Inmunización con DNA

Uno de los aspectos más interesantes de la vacunación con DNA es la naturaleza de las células presentadoras de antígeno (APCs) responsables de la inducción de respuestas CTL. Aunque las vías celulares para el procesamiento de antígenos para la presentación MHC-restringida a los linfocitos T, han sido estudiados con exquisito detalle (ver Watts, en este volumen), la naturaleza y la extensión de la cooperación entre las células somáticas y las células presentadoras de antígeno, para la presentación de antígeno in vivo, no son bien entendidas todavía. La capacidad de las proteínas secretadas para ser introducidas por endocitosis y entrar en la vía del procesamiento del antígeno que finalmente conduce a la presentación vía moléculas MHC clase II es bien conocida. Los mecanismos por los cuales los antígenos virales pueden ser presentados vía moléculas MHC clase I a los linfocitos T CD8⁺ vírgenes, pueden ser más complejos. Los diferentes virus pueden infectar en grado variable a las células presentadoras de antígeno "profesionales" y así, la inducción de las respuestas inmunes a diferentes virus pueden emplear la cooperación entre células somáticas y APCs en grado variable.

Después de la inyección i.m. de vacunas de DNA los miocitos pueden ser el tipo predominante de células transfectadas. Por lo tanto, cualesquiera que sean los mecanismos cooperativos de procesamiento de antígeno pueden ser de particular importancia en las respuestas inmunes inducidas por inmunización con DNA. Algunas de las maneras por las cuales la CTL restringida por MHC clase I podría ser inducida después de la vacunación con DNA incluyen: (i) la presentación de antígeno mediada directamente por miocitos transfectados, (ii) las APCs profesionales que llegan a ser transfectadas y sirven como APCs y (iii) la transferencia de antígeno de los miocitos transfectados a las APCs profesionales. Se ha demostrado que las APCs profesionales, después de la inmunización con DNA, presentan el antígeno de una manera restringida por MHC clase I y que las células musculares pueden producir el antígeno que entra en esta ruta. Las observaciones siguientes están relacio-

nadas con estos tópicos. Las células musculares fueron transfectadas directamente con vacunas de DNA de NP (106) y la ruta de administración i.m. de DNA de NP produjo la mejor protección mediada por CMI (84). Esto fue ilustrado por estudios en los cuales mioblastos C2C12 fueron transfectados establemente con el gen NP de influenza y después transplantadas a ratones C3H histocompatibles (106). Una respuesta de CTL restringida por H-2K^k fue inducida aunque la síntesis del antígeno fue limitada a los miocitos (106). De esta manera la producción de un antígeno viral por células somáticas solamente, fue suficiente para estimular CTL y CMI protectoras. Entonces, la transfección de las APCs profesionales no fue requerida para la inducción de CTL.

En segundo lugar, las células principales presentadoras de antígeno, responsables de la inducción de CTL después de la inyección i.m. de DNA de NP de influenza eran derivadas de la médula ósea. Cuando las quimeras de médula ósea parental→F1 fueron inmunizadas con DNA de plásmido que codificaba para NP de influenza, por inyección i.m. o inyectados con mioblastos transfectados establemente con un gen que codificaba para NP, las respuestas CTL detectables fueron observadas, solamente, contra el péptido presentado por las moléculas MHC clase I halladas en la médula ósea del donador (108). Estos datos son soportados por estudios en los cuales se usaron ratones con inmunodeficiencia combinada (scid), los cuales carecen de células linfoides funcionales pero tienen células miocíticas normales. La inyección de DNA de plásmidos en ratones scid H-2^b o H-2^d que han sido reconstituídos con células de bazo normal H-2^{db}, indujo CTL restringida por el haplotipo del scid receptor. Si se transfería la médula ósea y el bazo de la F1 se obtenía CTL restringida por cada haplotipo, sugiriendo que la presentación de antígeno restringida por MHC clase I en el modelo, puede ser facilitada por las APCs derivadas de la médula ósea (108a). Resultados similares han sido observados en ratones inmunizados con pistola de genes, en los cuales puede ocurrir la transfección directa de las APCs y la transferencia de antígeno (108b; B Barber, comunicación personal).

El mecanismo por el cual ocurre la transferencia de antígeno entre las células somáticas y las APCs no es conocido; un posible candidato es la sensibilización cruzada. La sensibilización cruzada, la habilidad de los antígenos producidos por células no presentadoras de antígenos de sensibilizar los CTL en el con-

texto de moléculas MHC presentes solamente en APCs "profesionales"; esto ha sido demostrado en quimeras de médula ósea de ratón parental→F1 en otros sistemas experimentales (107). Por ejemplo, una línea celular de adenocarcinoma de colon del haplotipo H-2^d, la CT26 que había sido transfectada con el gen NP de influenza, fue usada para inmunizar quimeras de médula ósea B6→CB6F1. Se produjo una respuesta de CTL restringida por H-2D^b, aunque las células CT26 no expresan H-2D^b (107). De manera similar, cuando los mioblastos C2C12 (H-2K^k) fueron transplantados a ratones (BALB/c x C3H)F1, se obtuvieron respuestas CTL que reconocían diferentes péptidos de epítopes presentados por H-2K^k (aminoácidos 50-57 de NP) y por H-2K^d (aminoácidos 147-155 de NP), aunque los mioblastos no expresaban H-2K^d. Estas respuestas fueron observadas aunque los mioblastos fueron transplantados intraperitonealmente, donde no se esperaba que ellos se fusionaran con células del hospedero (106). Estos estudios soportan la hipótesis de que los antígenos (o sus epítopes) sintetizados en las células somáticas del hospedador pueden ser transferidos a APC para la presentación en el contexto de moléculas MHC clase I. Estos experimentos muestran el papel dominante de las moléculas MHC de APC en la inducción de respuestas CTL y sugieren que las células somáticas pueden ser ineficientes en la presentación de antígeno en el contexto de MHC clase I a células T CD8⁺ no sensibilizadas, en la ausencia de las APC relacionadas aloantigénicamente.

Los mecanismos celulares por los cuales ocurre la sensibilización cruzada, no se han definido. La formación de complejos de epítopes peptídicos con moléculas MHC clase I en la sensibilización cruzada requiere genes TAP funcionales en las APC derivadas de la médula ósea, porque las quimeras de médula ósea hechas por injerto de médula ósea TAP^{-/-} en recipientes TAP^{+/+} fueron incapaces de responder a la NP expresada en células CT26 transfectadas (109). Estas quimeras pudieron responder a virus vaccinia recombinante que expresaba un minigen de péptido de NP ligado a un péptido de señal que permite la traslocación al ER (109). Estas observaciones sugieren que en la sensibilización cruzada, los antígenos proteicos no procesados son remitidos al citosol de las APCs. La vacunación intramuscular con un plásmido que codifica la NP indujo CTL específica para el péptido de los epítopes dominantes NP 50-57 en ratones H-2^k, NP 147-155 en ratones H-2^d y NP 366-372 en ratones H-2^b (106,110). Los péptidos

subdominantes naturalmente procesados también fueron presentados por inmunización con DNA. Un plásmido que codificaba una forma mutante de NP completa, en la cual los dos residuos de anclaje del epítipo 147-155 habían sido mutados, indujeron respuestas CTL contra un epítipo subdominante, 218-226, en ratones BALB/c. Las CTL que reconocieron este epítipo fueron capaces de matar células blanco infectadas con virus de influenza, indicando que el péptido o un epítipo estrechamente relacionado es naturalmente procesado y presentado en moléculas MHC clase I en la infección con virus de influenza (110). Por lo tanto, mientras que las APCs pueden ser transfectadas directamente después de una inyección i.m. de DNA, otra hipótesis razonable es que las células musculares actúan primariamente como fábricas para la producción de antígeno, el cual es transferido luego a una APC profesional derivada de médula ósea para ser procesado y presentado a los precursores CTL para la inducción de la CTL final.

En contraste con la vacunación por inyección i.m. de DNA, la vacunación por el bombardeo de partículas resulta en la transfección de células de la dermis y la epidermis por depósito directo de esferas de oro cubiertas con DNA. Por lo tanto, las APCs profesionales, tales como las células de Langerhans, residentes en la piel, son transfectadas directamente y pueden servir como APCs. El procesamiento TAP-independiente puede ocurrir después de la inmunización con la pistola de genes, debido a que una construcción que codifica para un péptido mínimo de un epítipo induce una CTL si el péptido está unido a una secuencia de señal de traslocación de ER (111). Un fenómeno similar ha sido observado para algunos péptidos administrados como minigenes en recombinantes de virus de vaccinia (109). Es posible que también ocurra el procesamiento TAP-dependiente, debido a que estas proteínas completas codificadas por plásmidos administrados por medio de la pistola de genes parece inducir CTL que reconoce péptidos procesados naturalmente (111). La inmunización por bombardeo de partículas en el pabellón de la

oreja de ratones, seguida de la remoción de la oreja poco después, indujo respuestas inmunes, lo que sugiere que el DNA mismo o las células transfectadas suficientes para inducir una respuesta inmune, escapan rápidamente del sitio de inmunización (SA Johnston, comunicación personal). Se necesita realizar otros estudios para determinar el destino final del DNA del plásmido en este sistema.

Adyuvanticidad del DNA

Las vacunas de DNA desnudo (por ejemplo, DNA de plásmido en solución salina) son efectivas en modelos animales sin la necesidad de adyuvantes o sistemas de administración. Parte de este comportamiento puede ser debido a un efecto inmunomodulador del DNA mismo. Una serie de artículos publicados durante los últimos años 80 y a comienzos de los 90, ha demostrado que secuencias específicas de nucleótidos presentes en el DNA bacterial son estimuladores de linfocitos (6,112,113). Ciertos motivos CpG pueden ser estimuladores o inhibidores, sugiriéndose que la presencia o ausencia de estas secuencias en vacunas de DNA pueden afectar la inmunogenicidad de la vacuna. En la inmunización intradérmica, la incorporación de un motivo estimulador en un plásmido aumentó las respuestas humoral y celular contra una proteína antigénica débil como la B-galactosidasa codificada por el mismo o un plásmido coinyectado (7). En la inyección i.m., un plásmido DNA no codificante, alteró el tipo de respuestas de anticuerpos contra un antígeno protéico co-inyectado, con un cambio a una predominancia del subtipo IgG2a en la presencia de DNA de una predominancia IgG1 en la ausencia de DNA (figura 3A); el plásmido también aumentó la respuesta de anticuerpos contra una proteína codificada por un plásmido co-inyectado (Figura 3B). Estas observaciones sugieren que el plásmido por sí mismo funciona como un adyuvante o un inmunomodulador. Alterando la secuencia de nucleótidos del vector se puede afectar la inmunogenicidad de las vacunas de DNA.

Consideraciones sobre la seguridad para el eventual uso en humanos

Las agencias reguladoras, considerando la aplicación de vacunas de DNA para uso humano, han identificado las siguientes como temas claves de preocupación: la integración potencial del DNA del plásmido en el genoma de las células hospederas; la inducción potencial de tolerancia inmune o de autoinmunidad y la inducción potencial de anticuerpos contra el DNA del plásmido inyectado.

Potencial para la Integración

La integración del DNA del plásmido inyectado en el genoma de la célula hospedera, en un animal vivo, puede ser silenciosa o podría, potencialmente, ser fenotípicamente mutagénico, si la integración rompe un gen celular, o potencialmente carcinogénico, si la ocurrencia de la integración inactivó un gen regulador de la división celular o activó un oncogene. La integración *in vitro* de genes foráneos en el genoma de líneas celulares hospederas es practicada ampliamente en muchas áreas de la biología celular y molecular. La integración puede ocurrir al azar o como resultado de la recombinación homóloga. Las condiciones óptimas para conseguir la integración como un resultado de la recombinación homóloga han sido definidas como sigue: la replicación concurrente del DNA del hospedador y del plásmido y la presencia de regiones largas (>600 bp) de homología densamente ensamblada entre el hospedero y el plásmido. En el caso de la vacunación intramuscular con DNA, el plásmido no contiene un origen de replicación que sea funcional en células eucarióticas, las células transfectadas (miocitos o macrófagos/células dendríticas), en su mayoría, no se dividen y los plásmidos usados solo contienen homología de secuencia muy limitada con el DNA de los mamíferos. Adicionalmente, aunque la integración al azar puede ocurrir 50-10.000 veces más frecuentemente que la recombinación homóloga, la vasta experiencia con la inmunización con vacunas con virus DNA vivos replicativos (por ejemplo, adenovirus o viruela) no ha resultado en eventos adversos, relacionados con integración. Los estudios directos de integración en ratones inyectados vía *i.m.* con DNA de plásmidos que codifica para NP de influenza, utilizando métodos sensibles como PCR (capaces de detectar una copia en 150.000 núcleos, lo cual ha sido calculado ser tres órdenes de magnitud me-

nor que la rata de mutación espontánea), no han detectado hasta ahora, la integración del plásmido inyectado (114).

Potencial para la Inducción de Tolerancia Inmunológica y Autoinmunidad

En algunos sistemas experimentales, la inyección repetida de pequeñas cantidades de antígeno ha conducido al desarrollo de estados de no-respuesta inmunológica. Se piensa que la cantidad de antígeno después de la inmunización con DNA es pequeña y que la expresión del antígeno después de la inmunización con DNA persiste por semanas o meses, así que existe la posibilidad formal de que pueda ser inducido el estado de no-respuesta en lugar de la inmunidad protectora. Los estudios descritos arriba demuestran ampliamente la habilidad de la vacunación con DNA de inducir respuestas inmunes protectoras. Dos estudios adicionales se relacionan directamente con este tópico. Primero, una sola inmunización intramuscular de monos verdes Africanos con una dosis baja (10 µg) de DNA que codifica para HA de influenza en una mezcla de plásmidos DNA que codifican para diferentes proteínas de influenza (10 µg/construcción para un total de 70 µg de DNA) no indujo una respuesta detectable de anticuerpos séricos, pero si sensibilizó a los animales para una respuesta importante anamnésica de anticuerpos, después de subsiguientes inmunizaciones con virus de influenza inactivado o con DNA adicional de HA de influenza (115). En ratones que fueron inmunizados una vez con una sola inyección de 0.001-1.0 µg de DNA que codificaba para el HA de influenza A/PR/8/34, se observaron respuestas de anticuerpos, normales o elevadas, después de la inoculación de estos animales con DNA de HA o con virus de influenza inactivado o vivo (JB Ulmer, CM DeWitt, RR Deck, observaciones *sin publicar*). Así pues, hasta ahora, aún con dosis subinmunogénicas de vacunas de DNA, administradas vía intramuscular, no se ha demostrado la inducción de tolerancia en animales adultos jóvenes. Los ratones transgénicos que expresan el gen HBsAg bajo el control del promotor viral endógeno, tienen altos niveles de HBsAg en el hígado y circulante en el plasma y parecen ser tolerantes a este antígeno. La inyección de estos ratones con un plásmido DNA que co-

difica para HBsAg preS2+S, resultó en una respuesta de anticuerpos contra HBsAg, la eliminación de HBsAg de la circulación y la eliminación de la expresión del transgene del hígado (115a). Así, en este modelo, la inmunización con DNA parece abolir el estado de tolerancia a HBsAg que normalmente existe en estos ratones transgénicos. En los animales inmunizados por bombardeo de partículas, la situación es menos clara. Las inmunizaciones repetidas de monos Rhesus con una mezcla de construcciones que codifican para los genes Gag y Env de SIV, las inmunizaciones con pistola de genes condujeron a la declinación aguda de los anticuerpos contra Env, aunque las respuestas de anticuerpos y celular inmune contra Gag permanecían altas (45). En nuestros experimentos, usando DNA que codifica para Env y Gag de HIV-1 para la inmunización i.m., hemos observado respuestas antígeno-específicas de larga duración de anticuerpos, CTL y células T ayudadoras que dieron respuestas secundarias buenas en los modelos de ratones y primates no humanos (115b).

En neonatos, la vacunación con DNA puede inducir tolerancia en algunas especies aunque en otras no. La inyección de un plásmido que codifica para un antígeno de malaria, en ratones de 2-5 días de edad, previno una respuesta inmune a una inyección subsiguiente del mismo plásmido a las seis semanas de edad. Este efecto no fue observado cuando la proteína codificada fue inyectada en controles de la misma edad. Los ratones inyectados con el plásmido a los 2-5 días de edad y con la proteína codificada, a las seis semanas de edad, respondieron solamente a determinados epítopes presentes en la proteína recombinante, los cuales no eran reconocidos por los animales de seis semanas de edad inmunizados solamente con el plásmido DNA (115c). Sin embargo, la inyección de chimpancés con un plásmido DNA que codifica para el antígeno de superficie de hepatitis B al nacimiento y a los 2, 4 y 6 meses de edad, indujo anticuerpos contra el HBsAg y protegió a los animales frente a la descarga subsiguiente con HBV infeccioso (92). Así pues, la edad y la especie del individuo y el método de administración pueden ser una variable importante con respecto a la respuesta final a la inyección con DNA.

Otra preocupación teórica es que las respuestas autoinmunes pueden ocurrir como resultado de la destrucción inmune de células que expresan los genes de los antígenos. En el caso de la inmunización intramuscular con DNA, los estudios preclínicos han indicado que el número total de miotubos

transfectados en cualquier músculo es pequeño (1-5%) (116). Así, la destrucción inmune de esta proporción de células musculares sería muy poco probable de tener un efecto clínicamente significativo sobre el desempeño del músculo inyectado. Las células musculares son reemplazadas por la migración y fusión de células satélite dentro de los miotubos existentes como parte de un reemplazo celular normal, por lo tanto, es muy probable que cualquier fibra afectada fuera reparada rápidamente. La destrucción de células que expresan genes foráneos puede conducir a la liberación de componentes celulares teóricamente capaces de inducir respuestas autoinmunes. Sin embargo, este evento también ocurre en el curso de infecciones virales y bacteriales, como también en los procesos normales de remodelación de tejidos. Parece poco probable que las vacunas de DNA puedan causar un riesgo mayor en este respecto que las vacunas virales y bacteriales.

Potencial para la Inducción de Anticuerpos Anti-DNA

Otra consideración sobre la seguridad se refiere a la inducción potencial de respuestas inmunes contra el DNA del plásmido mismo. Se cree que los anticuerpos patogénicos anti-DNA son característicos de ciertas enfermedades autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico (SLE), ya que la mayoría (pero no todos) de los pacientes manifiestan esta característica de la enfermedad. Aún, la etiología de este fenómeno es pobremente comprendida. Se cree que varios factores juegan un papel, incluyendo la susceptibilidad genética y la disfunción inmune fundamental, pero no está claro si la exposición al DNA puede causar o exacerbar el SLE. Entonces, la posibilidad de inducción de anticuerpos anti-DNA patogénicos por la vacunación con DNA de plásmido requiere cuidadosa evaluación. Sin embargo, basados en varios hechos, este escenario no es probable que ocurra. Primero, el dsDNA purificado no induce anticuerpos anti-DNA. Los anticuerpos anti-dsDNA pueden ser inducidos en ratones normales por inoculación de DNA pero esto requiere que el DNA sea desnaturalizado, que forme complejos con albúmina sérica bovina metilada (mBSA) y co-administrado con adyuvante completo de Freund (CFA) (117). La vacunación de ratones con dsDNA, no importa su origen, no es efectivo en la inducción de anticuerpos anti-DNA. Segundo, los anticuerpos anti-DNA son circulantes en ratones y humanos normales (118). Estos anticuerpos son específicos en su

reactividad por DNA de una especie particular de bacteria y no reaccionan en forma cruzada con DNA de mamífero, sugiriéndose que estos anticuerpos fueron generados por exposición anterior al DNA bacterial durante la infección. Así pues, en la mayoría de los humanos se encuentran anticuerpos no patogénicos anti-DNA. Tercero, la vacunación de ratones pre-autoinmunes (NZB/NZW), los cuales, espontáneamente desarrollan anticuerpos patogénicos anti-DNA que conducen a la enfermedad y la muerte prematura, con complejos de DNA/mBSA/CFA, resultó en la aparición acelerada de estos anticuerpos (119). Sorprendentemente, sin embargo, estos ratones fueron protegidos contra la enfermedad y la muerte (120). En estudios separados, la vacunación de ratones susceptibles a lupus con DNA de plásmido purificado tuvo poco efecto sobre los niveles de anticuerpos anti-DNA y no tuvo efecto sobre la enfermedad o muerte (DM Klinman, comu-

nicación personal). Aún más, la vacunación con DNA no tuvo un efecto dañino sobre la enfermedad autoinmune en este modelo animal. Finalmente, la vacunación de animales normales con vacunas de DNA (dsDNA purificado) resultó en la inducción de pocos o ningún anticuerpo anti-DNA, medidos por un ELISA, inmunoblot o radioinmunoensayo (121,122, JB Ulmer, CM DeWitt, RR Deck, observaciones no publicadas). En estudios separados, ratones BALB/c inyectados con DNA de plásmido presentan elevaciones poco duraderas de células B secretoras de anticuerpos anti-DNA y ligeros aumentos de anticuerpos anti-DNA en el suero (DM Klinman, comunicación personal). Por lo tanto, mientras que todavía no se sabe si las vacunas de DNA son capaces de inducir anticuerpos anti-DNA en humanos, los estudios preclínicos en animales sugieren que esto es poco probable.

Conclusiones

Aunque la utilidad clínica final no ha sido probada, las vacunas de DNA han sido efectivas en la generación de respuestas inmunes y protección en una amplia variedad de modelos preclínicos de infecciones virales, bacterianas, parasitarias y cáncer. Ellas representan una manera de generar reactivos (anticuerpos y CTL), son una herramienta para estudiar los mecanismos de la presentación de antígeno, el papel de las citoquinas y los efectos del DNA bacterial en la generación de respuestas inmunes y proveen de una tecnología para el descubrimiento de antígenos para vacunas novedosas.

Agradecimientos

Nosotros queremos agradecer a nuestros colegas en el Departamento de Virus y Biología Celular cuya dedicación y experiencia han sido útiles en la apertura de este nuevo campo de investigación científica.

Referencias

- Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dworki VJ, Gromkowski SH, Deck RR, Dewitt CM, Friedman A, Hawe 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* 259:1745-49
- Ulmer JB, Deck RR, Dewitt CM, Friedman A, Donnelly JJ, Liu MA. 1994. Protective immunity by intramuscular injection of low-doses of influenzavirus DNA vaccines. *Vaccine* 12:1541-44
- Taylor PM, Askonas BA. 1986. Influenza nucleoprotein-specific cytotoxic T-cell clones are protective in vivo. *Immunology* 58:417-20
- Tang DC, Devit M, Johnston SA. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356:152-54
- Williams RS, Johnston SA, Riedy M, Devit MJ, McElligott SG, Sanford JC. 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2726-30
- Krieg AM, Yi A-K, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretsky GA, Klinman DM. 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374:546-48
- Sato Y, Roman M, Tighe H, Lee D, Corr M, Nguyen M-D, Silverman GJ, Lotz M, Carson D, Raz E. 1996. Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization. *Science* 273:352-54

8. Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martinez D, Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. 1993. Heterologous and homologous protection against influenza-A by DNA vaccination-optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* 12:777-83
9. Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41:521-30
10. Gorman CM, Merlino GT, Willingham MC, Pastan I, Howard BH. 1982. The Rous sarcoma virus long terminal repeat is a strong promoter when introduced into a variety of eukaryotic cells by DNA-mediated transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6777-81
11. Moreau P, Hen R, Wasyluk B, Everett R, Gaub MP, Chambon P. 1981. The SV40 72 base pair repeat has a striking effect on gene expression both in SV40 and other chimeric recombinants. *Nucl. Acids Res.* 9:6047-68
12. Pfarr DS, Rieser LA, Woychik RP, Rottman FM, Rosenberg M, Reff ME. 1986. Differential effects of polyadenylation regions on gene expression in mammalian cells. *DNA* 5:115-22
13. Chapman BS, Thayer RM, Vincent KA, Haigwood NL. 1991. Effect of intron A from human cytomegalovirus (Towne) immediate-early gene on Heterologous expression in mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19:3979-86
14. Yankauckas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dwarki VJ, Gromkowski SH. 1993. Long-term antinucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol.* 12:771-76
15. Wang B, Boyer J, Srikanthan V, Coney L, Carrano R, Phan C, Merva M, Dang K, Agadjanyan M, Gilbert L, Ugen KE, Williams WV, Weiner DB. 1993. DNA inoculation induces neutralizing immune-responses against human-immunodeficiency-virus type-1 in mice and nonhuman-primates. *DNA Cell Biol.* 12:799-805
16. Cox G, Zamb TJ, Babiuk LA. 1993. Bovine herpesvirus-1 immune-responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J. Virol.* 67:5664-67
17. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. 1993. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis-B surface-antigen and high-levels of circulating antibody. *Human Mol. Genet.* 2:1847-51
18. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl H. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199:132-40
19. Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9866-70
20. Hawkins RE, Zhu DL, Ovecko M, Winter G, Hamblin TJ, Long A, Stevenson FK. 1994. Idiotypic vaccination against human B-cell lymphoma-rescue of variable region gene-sequences from biopsy material for assembly as single-chain Fv personal vaccines. *Blood* 83:3279-88
21. Conry RM, Lobuglio AF, Kantor J, Schlom J, Loechel F, Moore SE, Sumerel LA, Barlow DL, Abrams S, Curiel DT. 1994. Immune-response to a carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine. *Cancer Res.* 54:1164-68
22. Watanabe A, Raz E, Kobsaka H, Tighe H, Baird SM, Kipps TJ, Carson D. 1993. Induction of antibodies to a kV region by gene immunization. *J. Immunol.* 151:2871-76
23. Geissler EK, Wang J, Fechner JH, Burlingham WJ, Knechtle SJ. 1994. Immunity to MHC class-I antigen after direct DNA transfer into skeletal-muscle. *J. Immunol.* 152:413-21
24. Knechtle SJ, Wang J, Jiao S, Geissler EK, Sumimoto R, Wolff JA. 1994. Induction of specific tolerance by intrathymic injection of recipient muscle cells transfected with donor class I major histocompatibility complex. *Transplantation* 57:990-96.
25. Manickan E, Rouse R, Yu ZY, Wire WS, Rouse BT. 1995. Genetic immunization against herpes-simplex-virus protection is mediated by CD4(+) T-lymphocytes. *J. Immunol.* 155:259-65
26. Ghiasi H, Cai S, Slanin S, Nesburn AB, Wechsler SL. 1995. Vaccination of mice with herpes-simplex virus type-1 glycoprotein-D DNA produces lowlevels of protection against lethal hsv-1 challenge. *Antiviral Res.* 28:147-57
27. McClements WL, Armstrong ME, Keys RD, Liu MA. 1996. The effect of immunization with DNA encoding HSV-2 glycoproteins on HSV-induced disease in mice and guinea pigs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:11,414-20
28. Bourne N, Stanberry LR, Bernstein DI, Lew D. 1996. DNA immunization against experimental genital herpes-simplex virus-infection. *J. Inf. Dis.* 173:800-7
29. Okuda K, Bukawa H, Hamajima K, Kawamoto S, Sekigawa KI, Yamada Y, Tanaka SI, Ishii N, Aoki I, Nakamura M, Yamamoto H, Cullen BR, Fukushima J. 1995. Induction of potent humoral and cell-mediated immuneresponses following direct-injection of DNA encoding the HIV type-1 env and rev gene-products. *Aids Res. Human Retrovir.* 11:933-43
30. Yang W, Waite GJ, McManus DP. 1995. Antibodies to *Schistosomajaponicum* (asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic-acid vaccination. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212:1029-39
31. Xu D, Liew FY. 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of 1-major. *Immunology* 84:173-76
32. Donnelly JJ, Martinez D, Jansen KU, Ellis RW, Montgomery DL, Liu MA. 1996. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *J. Infect. Dis.* 173:314-20
33. Sundaram P, Xiao W, Brandsma L. 1996. Particle-mediated delivery of recombinant expression vectors to rabbit skin induces high-titered polyclonal antisera (and circumvents purification of a protein immunogen). *Nucleic Acids Res.* 24:1375-77
34. Major ME, Vitvitski L, Mink MA, Schleaf M, Whalen RG, Trepo C, Inchauspe G. 1995. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune-responses against the hepatitis-C virus nucleocapsid. *J. Virol.* 69:5798-805
35. Lagging LM, Meyer K, Hoft D, Houghton M, Belshe RB, Ray R. 1995. Immune-responses to plasmid DNA encoding the hepatitis-C virus core protein. *J. Virol.* 69:5859-63
36. Kuhober A, Pudollek H-P, Reifenberg K, Chisari FV, Schlicht H-J, Reimann J, Schirmbeck R. 1996. DNA immunization induces antibody and cytotoxic T cell responses to hepatitis B core antigen in H-2b mice. *J. Immunol.* 156:3687-95
37. Agadjanyan MG, Wang B, Ugen KE, Villafana T, Merva M, Petrushina I, Williams WV, Weiner DB. 1994. DNA inoculation with an HTLV-1 envelope DNA construct elicits immune responses in rabbits. In *Vaccines 94*, ed. F Brown, RM Chanock, MS Ginsberg RA Lerner, pp. 47-53. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
38. Phillpotts RJ, Venugopal K, Brooks T. 1996. Immunisation with DNA polynucleotides protects mice against lethal challenge with St. Louis encephalitis virus. *Arch. Virol.* 141:743-49
39. Pande H, Campo K, Tanamachi B, Forman SJ, Zaia JA. 1995. Direct DNA immunization of mice with plasmid DNA encoding the tegument protein pp65 (ppu183) of human cytomegalovirus induces high-levels of circulating antibody to the encoded protein. *Scand. J. Infect. Dis.* S99:117-20

40. Pang A. 1994. Production of antibodies against *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin by injecting its plasmids. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 202: 1227-34
41. Lai WC, Bennett M, Johnston SA, Barry MA, Pakes SP. 1995. Protection against *Mycoplasma-pulmonis* infection by genetic vaccination. *DNA Cell Biol.* 14:643-51
42. Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Deck RR, DeWitt CM, Orme IM, Baldwi S, D'Souza CS, Drowart A, Lozes E, Vandebussche P, Mooren J-P, Liu MA, Ulmer JB. 1996. Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nature Med.* 2:893-98
43. Tascón RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB. 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Med* 2:888-92
44. Wan B, Boyer J, Srikantan V, Ugen K, Gilbert L, Phan C, Dang K, Merva M, Agadjanyan MG, Newman M, Carrano R, McCallus D, Coney L, Williams WV, Weiner DB. 1995. Induction of humoral and cellular immuno-responses to the human immunodeficiency type-1 virus in nonhuman-primates by in-vivo DNA inoculation. *Virology* 211:102-12
45. Lu S, Santoro JC, Fuller DH, Haynes JR, Robinson HL. 1995. Use of DNAs expressing HIV-1 env and noninfectious HIV-1 particles to raise antibody-responses in mice. *Virology* 209:147-54
46. Donnelly JJ, Friedman A, Martínez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL, Ulmer JB, Liu MA. 1995. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine-enhanced protection against antigenic drift in influenza-virus. *Nature Med.* 1:583-87
47. Justewicz DM, Morin MJ, Robinson HL, Webster RG. 1995. Antibody-forming cell response to virus challenge in mice immunized with DNA encoding the influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 69:7712-17
48. Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA, Ulmer JB. 1996. Characterization of humoral immune responses induced by an influenza hemagglutinin DNA vaccine. *Vaccine.* In press
49. Barret T, Inglis SC. 1985. Growth, purification and titration of influenza viruses. In *Virology, A Practical Approach*, ed. B.W.J. Mahy, 119-150. Oxford:IRL. 264 pp.
50. Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, Baird SM, Rhodes GH. 1995. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular-immunity to viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:9519-23
51. Michel ML, Davis HL, Schleef M, Mancini M, Tiollais P, Whalen RG. 1995. DNA-mediated immunization to the hepatitis-B surface-antigen in mice-aspects of the humoral response mimic hepatitis-B viral-infection in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 92:5307-11
52. Lu S, Arthos J, Montefiori DC, Yasutomi Y, Manson K, Mustafa F, Johnson E, Santoro JC, Wissink J, Mullins JI, Haynes JR, Letvin NL, Wyand M, Robinson HL. 1996. Simian immunodeficiency virus DNA vaccine trial in macaques. *J. Virol.* 70:3978-91
53. Mor G, Klinman DM, Shapiro S, Hagiwar E, Sedegah M, Norman JA, Hoffman SL, Steinberg AD. 1995. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium-yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. *J. Immunol.* 155:2039-46
54. Mitchell WM, Rosenbloom ST, Gabriel J. 1995. Induction of mucosal anti-HIV antibodies by facilitated transfection of airway epithelium with lipospermine/DNA complexes. *Immunotechnology* 1:211-19
55. Jones DH, Corris S, McDonald S, Clegg JCS, Farrar GH. 1996. Immune responses following oral and parenteral administration of plasmid DNA encapsulated in poly(lactide-coglycolide) microparticles. *Vaccine.* In press
56. Hsu C-H, Chua K-Y, Tao M-H, Lai YL, Wu H-D, Huang S-K, Hsieh K-H. 1996. Immunoprophylaxis of allergen-induced immunoglobulin E synthesis and airway hyperresponsiveness in vivo by genetic immunization. *Nature Med.* 2:540-44
57. Raz E, Tighe H, Sato Y, Corr M, Dudler JA, Roman M, Swain SL, Spiegelberg HL, Carson DA. 1996. Preferential induction of a Th 1 immune response and inhibition of specific IgE antibody formation by plasmid DNA immunization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5141-45
58. Davis HL, Michel M-L, Mancini M, Schleef M, Whalen RG. 1996. DNA-based immunization overcomes H-2 haplotype-restricted nonresponsiveness to HBsAg in mice. In *Vaccines 96*, ed. F Brown, RM Chanock, MS Ginsberg, RA Lerner, pp. 111-116. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
59. Rhodes GH, Abai AM, Margalith M, Kuwahara-Rundell A, Morrow J, Parker SE, Dwarki VJ. 1994. Characterization of humoral immunity after DNA injection. In *Recombinant Vectors in Vaccine Development, Dev. Biol. Stand.*, ed. F. Brown, 82:229-236. Basel: Karger
60. Ramshaw IA. 1996. Cytokines and nucleic acid vaccination. *Vaccine.* In press
61. Xiang ZQ, Ertl H. 1995. Manipulation of the immune-response to a plasmid-encoded viral-antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 2:129-35
62. Conry RM, Widera G, Lobuglio AF, Fuller JT, Moore SE, Barlow DL, Tumer J., Curiel DT. 1996. Selected strategies to augment polynucleotide immunization. *Gene Therapy* 3:67-74
63. Tascón R, Stavropoulos E, Colston MJ, Lowrie DB. 1996. Polyucleotide vaccination induces a significant protective immune response against Mycobacteria. In *Vaccines 96*, ed. F Brown, RM Chanock, MS Ginsberg, RA Lerner, pp. 45-49. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
64. Barry MA, Barry ME, Johnston SA. 1994. Production of monoclonal antibodies by genetic immunization. *BioTechniques* 16:616-20
65. Schirmbeck R, Bohm W, Ando K, Chisari FV, Reiman J. 1995. Nucleic-acid vaccination primes hepatitis-B virus surface antigen-specific cytotoxic T-lymphocytes in nonresponder mice. *J. Virol.* 69:5929-34
66. Liu MA, Davies ME, Yasutomi Y, Perry HC, Letvin NL, Shiver JW. 1994. Immune responses to HIV generated by DNA vaccines. In *Retroviruses of Human AIDS and Related Animal Diseases*, ed. M Girard, B Dodet, pp. 197-200. Lyon: Fond. Merce-merieux
67. Shiver JW, Perry HC, Davies ME, Freed DC, Liu MA. 1995. Cytotoxic T-lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772:198-208
68. Liu MA, Yasutomi Y, Davies ME, Perry HC, Letvin NL, Shiver JW. 1996. Vaccination of mice and nonhuman primates using HIV gene-containing DNA. *Antibiotics and Chemotherapy* 48:100-104
69. Wang B, Merva M, Dang KS, Ugen KE, Boyer J, William WV, Weiner DB. 1994. DNA inoculation induces protective in-vivo immune-responses against cellular challenge with HIV-1 antigenexpressing cells. *Aids Res. Human Rctroviruscs* 10:S35-S41
70. Xiang ZQ, Spitalnik S, Cheng J, Erikson J, Wojczyk B, Ertl HCJ. 1995. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology* 209:569-79
71. Yokoyama M, Zhang J, Whitton JL. 1995. DNA immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Virology* 69:2684-88
72. Pedroza-Martins L, Lau LL, Asano MS, Ahmed R. 1995. DNA

- vaccination against persistent viral infection. *J. Virol.* 69:2574-82
73. Manickan E, Yu Z, Rouse RJD, Wire WS, Rouse BT. 1995. Induction of protective immunity against the herpes simplex virus with DNA encoding the immediate early protein ICP 27. *Viral Immunol.* 8:53-61
 74. Ulmer JB, Deck RR, Yawman AM, Friedman A, DeWitt CM, Martínez D, Donnelly JJ, Liu MA. 1995. DNA vaccines for bacteria and viruses. In *Vaccine: Novel Strategies in Design and Production*, Proc. 39th OHOLO Conf., ed. A Schafferman, pp., 49-53. New York: Plenum
 75. Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. 1996. Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. *Ann. New York Acad. Sci.* 772:40-46
 76. Hui KM, Sabapathy TK, Oei A, Chia TF. 1994. Generation of allo-reactive cytotoxic T lymphocytes by particle bombardment-mediated gene transfer. *J. Immunol. Meth.* 171:147-55
 77. Fuller DH, Haynes JR. 1994. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 10:1433-41
 78. Shiver JW, Perry HC, Davies ME, Liu MA. 1995. Immune responses to HIV gp120 elicited by DNA vaccination. In *Vaccines 95*, ed. F Brown, RM Chanock, HS Ginsberg, E Norrby, pp. 95-8. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press
 79. Yasutomi Y, Robinson HL, Lu S, Mustafá F, Lekutis C, Arthos J, Mullins JJ, Voss G, Manson K, Wyand M, Letvin NL. 1996. Simian immunodeficiency virus-specific cytotoxic T lymphocyte induction through DNA vaccination of Rhesus monkeys. *J. Virol.* 70:678-81
 80. Zarozinski CC, Fynan EF, Selin LK, Robinson HL, Welsh RM. 1995. Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein. *J. Immunol.* 154:4010-17
 81. Pertmer TM, Eisenbraun MD, McCabe D, Prayaga SK, Fuller DF, Haynes JR. 1995. Gene gun-based nucleic-acid immunization-elicitation of humoral and cytotoxic T-lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 13:1427-30
 82. Hoffman SL, Doolan DL, Sedegah M, Gramzinski R, Wang H, Gowda K, Hobart P, Margalith M, Norman J, Hedstrom RC. 1995. Nucleic acid malaria vaccines: current status and potential. *Ann. New York Acad. Sci.* 772:88-94
 83. Ertl HCJ, Verna P, He Z, Xiang ZQ. 1995. Plasmid vectors as anti-viral vaccines. *Ann. New York Acad. Sci.* 772:77-87
 84. Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. 1994. Immunization with DNA. *J. Immunol. Meth.* 176:145-52
 85. Street NE, Mosmann TR. 1991. Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns. *FASEB J.* 5:171-77
 86. Romagnani S. 1995. Biology of human TH1 and TH2 cells. *J. Clin. Immunol.* 15: 121-29
 87. Heinzel FP. 1995. Th1 and Th2 cells in the cure and pathogenesis of infectious diseases. *Curr Opin. Infect. Dis.* 8:151-55
 88. Shiver JW, Perry HC, Davies ME, Freed DL, Liu MA. 1995. Cytotoxic T lymphocyte and helper T cell responses following HIV polynucleotide vaccination. *Ann. NY Acad. Sci.* 772:198-208
 89. Shiver JW, Ulmer JB, Donnelly JJ, Liu MA. 1996. Humoral and cellular immunities elicited by DNA vaccines: application to the human immunodeficiency virus and influenza. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 21:19-31
 90. 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* 90:11,478-82
 91. Webster RG, Fynan EF, Santoro JC, Robinson H. 1994. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the hemagglutinin. *Vaccine* 12:1495-98
 92. Prince AM, Whalen R, Brotman B. 1996. Successful DNA-based HBV immunization of newborn chimpanzees. *Vaccine*. In press
 93. Christensen ND, Kreider JW. 1991. Neutralization of CRPV infectivity by monoclonal antibodies that identify conformational epitopes on intact virions. *Virus Res.* 21:169-79
 94. Barry MA, Lai WC, Johnston SA. 1995. Protection against mycoplasma-infection using expression-library immunization. *Nature* 377:632-35
 95. Anderson R, Gao X-M, Papakonsantinopoulou A, Roberts M, Dougan G. 1996. Immune response in BALB/c mice following intramuscular immunization with DNA encoding fragment C of tetanus toxin. *Infect. Immun.* 64:3168-73
 96. López-Macias C, Lopez-Hernandez MA, Gonzalez CR, Isibasi A, Ortiz-Navarrete V. 1996. Induction of antibodies against *Salmonella typhi* OmpC porin by naked DNA immunization. *Ann. N. Y Acad. Sci.* 772:285-88.
 97. Xu D, Liew FY. 1995. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunology* 84:173-76
 98. Hoffman SL, Sedegah M, Hedstrom RC. 1994. Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic-acid vaccine. *Vaccine* 12:1529-33
 99. Doolan DL, Sedegah M, Hedstrom RC, Hobart P, Charoenvit Y, Hoffman SL. 1996. Circumventing genetic restriction of protection against malaria with multigene DNA immunization: CD8+ T cell-, interferon γ -, and nitric oxide-dependent immunity. *J. Exp. Med.* 183:1739-46
 100. Trinchieri G. 1995. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13:251-76
 101. Stevenson FK, Zhu D, King CA, Ashworth LJ, Kumar S, Hawkins RE. 1995. Idiotypic DNA vaccines against B-cell lymphoma. *Immunol. Rev.* 145:211-28
 102. Conry RM, LoBuglio AF, Loechel F, Moore SE, Sumerel LA, Barlow DL, Curiel DT. 1995. A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has in vivo antitumor activity. *Gene Ther.* 2:59-65
 103. Graham RA, Burchell JM, Beverley P, Taylor-Papadimitriou J. 1996. Intramuscular immunisation with MUC1 cDNA can protect C57 mice challenged with MUC1-expressing syngeneic mouse tumor cells. *Int. J. Cancer* 65:664-70
 104. Halpern MD, Kurlander RJ, Pisetsky DS. 1996. Bacterial DNA induces murine interferon- γ production by stimulation of interleukin-12 and tumor necrosis factor- α . *Cell. Immunol.* 167:72-78
 105. Potter CW, Jennings R, Phair JP, Clarke A, Stuart-Harris CH. 1977. Dose response relationship after immunization of volunteers with a new, surface-antigen-adsorbed influenza virus vaccine. *J. Infect. Dis.* 155:423
 106. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Donnelly JJ, Liu MA. 1996. Generation of MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes by expression of a viral protein in muscle cells: antigen presentation by non-muscle cells. *Immunology* 89:59-67

107. Huang AYC, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll DM, Levitsky H. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264:961-65
108. Fu TM, Ulmer JB, Caulfield MJ, Deck RR, Friedman A, Wang S, Liu X, Donnelly JJ, Liu MA 1996. Transfer of antigen for priming CTL responses: requirement for bone marrow-derived antigen-presenting cells for injection and DNA vaccines. Submitted
- 108a. Doe B, Selby M, Barnett S, Baenziger J, Walker CM. 1996. Induction of cytotoxic T-lymphocytes by intramuscular immunization with plasmid DNA is facilitated by bone-marrow-derived cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8578-83
- 108b. Condon C, Watkins SC, Celluzi CM, Thompson K, Falo LD. 1996. DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells. *Nature Med.* 2:1122-28
109. Huang AYC, Bruce AT, Pardoll DM, Levitsky HI. 1996. In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter. *Immunity* 4:349-55
110. Fu TM, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ. 1996. Protective cellular immunity induced by DNA immunization: CTL responses against dominant and recessive epitopes of influenza virus nucleoprotein. *J. Virology*. In press
111. Ciernik IF, Berzofsky JA, Carbonc DC. 1996. Induction of cytotoxic T lymphocytes and antitumor immunity with DNA vaccines expressing single T cell epitopes. *J. Immunol* 156:2369-75
112. Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS. 1991. Stimulation of in vitro murine lymphocyte proliferation by bacterial DNA. *J. Immunol.* 147:1759-64
113. Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T. 1992. Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce TNF and augment TNF-mediated natural killer activity. *J. Immunol.* 148:4072-76
114. Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Troilo PJ. 1995. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772:30-39
115. Liu MA, McClements WL, Friedman A, Ulmer JB, Shiver JW, Donnelly JJ. 1996. Immunization of primates with DNA vaccines. *Vaccine*. in press
- 115a. Mancini M, Hadchouel M, Davis HL, Whalen RG, Tollais P, Michel ML. 1996. DNA-mediated immunization breaks tolerance in a transgenic mouse model of hepatitis B surface antigen chronic carriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12,496-501
- 115b. Letvin NL, Montefiori DC, Yasutomi Y, Perry HC, Davies ME, Lekutis C, Alroy M, Freed DL, Lord CI, Handt LK, Liu MA, Shiver JW. 1996. Potent, protective, anti-HIV immune response generated by bimodal HIV Env DNA plus protein vaccination. Submitted
- 115c. Klinman DM, et al. 1996. *J. Clin. Invest* in press
116. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247:1465-68
117. Gilkeson GS, Pritchard AJ, Pisetski DS. 1992. Specificity of anti-DNA antibodies induced in normal mice by immunization with DNA. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 59:288-300
118. Robertson CR, Pisetski DS. 1992. Specificity analysis of antibodies to single-stranded micrococcal DNA in the sera of normal human subjects and patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheumatol.* 10:589-94
119. Gilkeson GS, Phippen AM, Pisetski DS. 1995. Induction of cross-reactive anti-dsDNA antibodies in preautoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J. Clin. Invest.* 95:1398-1402
120. Gilkeson GS, Ruiz P, Phippen AM, Alexander AL, Lefkowitz JB, Pisetski DS. 1996. Modulation of renal disease in autoimmune NZB/NZW mice by immunization with bacterial DNA. *J. Exp. Med* 183:1389-97
121. Jiao S, Williams P, Berg RK, Hodgeman BA, Liu I, Repetto G, Wolff JA. 1993. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers in vivo. *Hum. Gene Ther.* 3:21-33
122. Katsumi A, Emi N, Abe A, Hasegawa Y, Ito M, Saito H. 1994. Humoral and cellular-immunity to an encoded protein-induced by direct DNA injection. *Hum. Gene Ther.* 5:1335-39