

# SELECCIONES



## ENSAYO

### Vacunas antivirales de última generación



Juan D Rodas G<sup>1</sup>, MV, MS, Ph.D.

<sup>1</sup>Grupo Centauro, Escuela de medicina Veterinaria, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, AA 1226, Medellín, Colombia.  
juandavid.rodas@gmail.com

(Recibido: 1 noviembre, 2005; aceptado: 18 enero, 2006)

#### Prefacio

Antes de iniciar este tema vale la pena mencionar que hasta el momento las técnicas tradicionales para producir vacunas, y por estas entiéndase vacunas a virus “vivo modificado” o también llamadas “atenuadas” y las vacunas a “virus muerto”, también llamadas vacunas inactivadas”, han sido las más exitosas. Incluso sin conocer exactamente como actuaban o el agente causante de la infección y de la enfermedad, fueron las primeras e irónicamente siguen siendo, a pesar de todos los adelantos de la biología molecular y la manipulación genética, las que nos han brindado mayor bienestar e incluso la posibilidad de erradicación, a pesar de todos los inconvenientes que se les puedan encontrar o los mejoramientos que se les puedan sugerir.

Este pequeño ensayo es entonces, al menos desde el punto de vista del autor, una muestra de lo que ha representado la vacunología desde la “explosión” de

técnicas moleculares disponibles para manipulación de los ácidos nucleicos y las proteínas, un campo promisorio con visos de ciencia ficción que aún no da los frutos esperados. No quiero sin embargo sonar pesimista, en los próximos 20 años seguramente veremos (o al menos así lo espero), como finalmente, esta nueva tecnología nos ofrecerá sus mejores dividendos en términos del mejoramiento de la prevención y el control de las enfermedades virales humanas y animales.

#### Introducción

Como punto de partida, me gustaría evaluar las características de las que han sido las vacunas tradicionales con el fin de reconocer de este modo cuales son las fortalezas que esperaríamos imitar con un nuevo biológico inexistente para una infección viral dada o las limitaciones de los productos de la “vieja guardia” que esperaríamos poder corregir con las nuevas propuestas.

**Tabla 1.** Ventajas y limitaciones de las vacunas vivas e inactivadas \*

Propiedad	Vacuna atenuada	Vacuna Inactivada
Ruta de administración	Natural o inyección	Inyección
Costo de la dosis viral	Bajo	Alto
Número de dosis	Generalmente una sola	Múltiple
Necesidad de adyuvante	No	Si
Duración de inmunidad	Muchos años	Generalmente < vivas
Respuesta de anticuerpos	Ig G, Ig A (ruta mucosal)	Ig G
Respuesta celular	Buena	Generalmente ausente
Sensibilidad al calor	Si	No
Interferencia	Solo conocida en Polio oral	No
Efectos secundarios	Ocasionales, leves	Ocasionales (locales)
Reversión a virulencia	Rara pero posible (Polio)	No

\* Frank Fenner. 1997. Virología Médica y Virología Veterinaria. Capítulo 13: Inmunization against viral diseases.

Como podemos ver de acuerdo con la tabla anterior, con estas dos únicas elecciones aún nos quedaría mucho espacio disponible para mejorar si deseamos obtener una vacuna óptima y esto hablando de los casos en los cuales ya poseemos al menos una opción. Si nos detenemos por ejemplo en la primera característica, tenemos que admitir que sería muy deseable encontrar biológicos de aplicación oral que facilitarían los programas de vacunación masivos, reduciendo costos y, dependiendo del caso, incluso, induciendo inmunidad en mucosas que son la puerta de entrada a muchas de las infecciones virales. El costo por supuesto debería ser bajo y para esto deseáramos poder aplicar una dosis que indujera inmunidad duradera y amplia tal como lo hacen las vacunas atenuadas. Sin embargo, preferiríamos que el biológico no necesitara conservarse en frío pues esto encarecería su transporte y correríamos el riesgo de que se inactivara antes de su uso. Finalmente, pero tal vez de manera más importante, querríamos que el producto fuese absolutamente seguro, es decir que no causara daño alguno al animal o persona a la cual se inoculara, puesto que sería muy irónico inducir injuria con aquello que pretendemos repararla o prevenirla y además por que se trata de productos de uso masivo que serían aplicados a individuos quienes podrían incluso no llegar a infectarse nunca con el agente en cuestión.

Una consideración adicional que vale la pena hacer y no se encuentra incluida en la tabla de arriba, es que el riesgo de producir daño no esta asociado únicamente a los agentes vivos modificados; existen importantes registros en la historia de las vacunas de productos inactivados que recibieron un tratamiento incompleto y terminaron produciendo problemas epidémicos. Un ejemplo de esto último, fue el incidente Cutter en la década de 1950 a 1960, cuando los laboratorios Cutter en Berkley (California) fallaron al eliminar agregados de virus desde las preparaciones de vacuna de Polio inactivado. El virus en dichos agregados no fue suficientemente expuesto a los efectos inactivantes de la formalina y 60 niños vacunados al igual que 89 familiares de ellos desarrollaron poliomielitis!. También se han dado casos de contaminación cruzada con virus que infectan los cultivos celulares utilizados para la producción de vacunas tales como el virus denominado SV-40 encontrado en células de mono verde africano (Vero).

Una cualidad adicional que le exigiríamos a nuestra vacuna sería que “idealmente” indujera inmunidad protectora en la población como conjunto y en este sentido debería imitar a los biológicos atenuados. Lo

anterior quiere decir que no todos los individuos en la población tendrían que ser inmunizados para detener la diseminación del virus, sería suficiente con que un número representativo de la misma se inmunizara para impedir la transmisión del mismo. Es bien conocido que en muchas de las infecciones virales, la transmisión se detiene cuando el virus cae por debajo de un umbral requerido para sostener la infección en la población.

### Vacunas de nueva generación

Para concentrarnos en el tema, es bueno destacar una tercera clasificación de las vacunas como producto de los primeros intentos de cambio en los acercamientos clásicos a la producción de biológicos para la prevención de las enfermedades infecciosas: las vacunas con base en sub-unidades virales.

Hace ya más de 25 años se reconoció la capacidad de desarrollar una vacuna que consistiera de sólo unas cuantas de las proteínas virales. Estas como en el caso del antígeno de superficie de la Hepatitis B (HBsAg) podrían ser purificadas a partir del plasma de individuos previamente expuestos al agente (portadores crónicos) o como sucedió más tarde, gracias a la producción a escala de la misma en los vectores de expresión bacterianos conocidos como plásmidos.

Así pues, la clonación del gen que codificaba por la proteína de superficie de la hepatitis B en un plásmido a su vez introducido en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, permitió la producción a escala de dicha proteína. Posteriormente la proteína de interés, purificada a partir de la levadura constituiría la primera, y única hasta nuestros días, vacuna recombinante con licencia para uso en humanos.

Vale la pena mencionar que de la misma forma que el gen de la HBsAg es clonado en plásmidos y expresado en levadura, también se podría pensar que las bacterias deberían ser un recurso apropiado para la replicación de dicho vector y la reproducción a escala de la proteína de interés. Sin embargo, es necesario recordar que en muchas ocasiones necesitamos que las proteínas expresadas, posean modificaciones post-traduccionales tipo glicosilación, adición de radicales sulfuro u otros, que cambian la estructura tridimensional de la molécula y que se requieren para su apropiado reconocimiento por parte del sistema inmune. Por este motivo, los sistemas de procarotes los cuales no producirían el resultado apropiado han sido menos

empleados, en particular cuando se trata de proteínas de superficie. Otras alternativas ampliamente usadas serían la transfección de los plásmidos recombinantes a células de insecto o mamífero que al igual que la levadura si producen los cambios post- traduccionales necesarios para el reconocimiento inmunológico. Valga anotar que también las proteínas de los virus que poseen genomas RNA podrían ser expresados en estos sistemas siguiendo un paso adicional de producción de DNA copia del gen de interés.

### **Virus vivos recombinantes como vacunas antivirales**

Una vez la OMS sugirió dejar de vacunar contra la viruela, el virus de vaccinia se convirtió en un excelente candidato como vector de expresión para genes foráneos. La idea con esta tecnología era insertar el gen de la proteína de superficie de cualquier virus elegido, dentro del genoma de un virus avirulento, administrado como vacuna viva recombinante. De esta manera la proteína abundantemente expresada al interior de las células del individuo inoculado, induciría una respuesta inmune no solamente de tipo humoral si no también celular. Este constructo ha sido usado en innumerables ensayos, incorporando genes de un amplio rango de otros virus entre los que se cuentan el HBsAg, la Hemoaglutinina (HA) del virus de influenza y la glicoproteína (Gp) del virus de la rabia. Este último precisamente, ha sido la segunda aplicación de la tecnología recombinante que ha logrado comercializarse. El racoonpox, un pox virus de los mapaches, familiar del virus de vaccinia que fuera usado como vacuna contra la viruela humana y que ha sido genéticamente modificado para portar el gen de la glicoproteína de la envoltura del virus de la rabia; protege zorros y otros animales silvestres contra la infección con este último, a través de cebos lanzados desde helicópteros en varios países de Europa.

Debido al gran tamaño de su genoma, a la presencia de múltiples genes que no parecen ser esenciales para el ciclo de vida del agente y al conocimiento genético logrado; el virus de vaccinia representa un excelente instrumento molecular para la expresión de genes foráneos. Su capacidad de almacenamiento es tal que se ha dicho que puede acomodar al menos una docena de genes foráneos y todavía ser empacado satisfactoriamente dentro del virión. De esta manera se ha planteado que sería teóricamente posible, construir un sólo virus recombinante como vacuna,

capaz de proteger contra la mayoría de la enfermedades virales infecciosas de la infancia. Por lo tanto, el beneficio potencial de la utilización de este agente, en particular para el tercer mundo, es evidente.

Después de los anteriores argumentos resulta contradictorio que aún existan partidarios de la destrucción total del agente que fue erradicado. Posiblemente motivados por el temor y la paranoia de la posibilidad de un accidente o un ataque deliberado, algunos sectores de la comunidad científica plantean que todo los stocks de laboratorio deberían ser eliminados, como si se tratara simplemente de una “mala colección de genes” que deben ser destruidos. En este mismo sentido valdría la pena preguntarse si al destruir el agente de la vacuna, ¿no se estaría también destruyendo la biodiversidad y un pool de genes que aún no son bien entendidos? o también preguntarse si ¿no estaríamos destruyendo un instrumento invaluable para el desarrollo de vacunas y productos antivirales?

Existen otros virus con genoma DNA de las familias Poxviridae, Herpesviridae y Adenoviridae que también han sido usados como vectores virales, cada uno con sus propias ventajas y desventajas. Entre otros vale la pena mencionar que los Poxvirus pueden producir complicaciones en 1 de cada 100.000 personas con una incidencia substancialmente mayor en paciente inmuno-comprometidos. Sin embargo, este inconveniente ha sido superado gracias a la producción de mutantes con delección de los genes patógenos o usando poxvirus aviares que si bien, expresan los genes foráneos en mamíferos, se replican en ellos de manera restringida. La incorporación de otros genes inductores de citoquinas también ha ayudado a potenciar la respuesta inmune.

### **Bacterias vivas como vectores de expresión viral**

En este caso bacterias entéricas atenuadas tales como la *Salmonella typhi*, la *Salmonella typhimurium* y la *E. coli*, representan los mejores ejemplos de vectores de expresión para epitopes protectores de virus entéricos virulentos. Los virus, cuyas proteínas son expresados en estas bacterias, se multiplican habitualmente en el intestino y por lo tanto representan un vehículo ideal para la inducción de una respuesta protectora en el sistema inmune del hospedero. En este caso el DNA foráneo se inserta en una región del genoma de la bacteria que codifica por

dominios de superficie prominente sobre una proteína normalmente situada en el exterior del organismo.

### **Vacunas con base en proteínas purificadas o péptidos sintéticos**

Tiene mucho sentido que si se conocen las proteínas virales contra las cuales se monta regularmente la respuesta inmune, se trate de purificar estas a partir del tratamiento de los viriones con detergentes y usarlas como vacunas. De esta manera nos estaríamos evitando todos los posibles inconvenientes planteados por la posible reversión a la virulencia de los agentes atenuados, y de paso estaríamos removiendo una gran cantidad de componentes no esenciales del virión, en el caso de los virus inactivados, los cuales podrían inducir respuestas indeseables o desgaste innecesario del sistema inmune. De esta manera le estaríamos dando al individuo sólo los inmunógenos relevantes tales como las proteínas de superficie contra las que generalmente se desarrollan los anticuerpos neutralizantes. La otra posibilidad sería sintetizar en forma química los péptidos que corresponden a los dominios antígenicos. Aunque en la teoría, esta idea suena convincente y favorece la producción de anticuerpos neutralizantes en algunos casos (anticuerpos sintetizados contra VIH), en la práctica este tipo de aproximación ha sido frustrante con muchos otros virus y se cree que la razón principal de esto es que en el antígeno nativo la mayoría de los epítopes reconocidos por los anticuerpos no son en realidad continuos o lineales y en cambio se presentan de manera plegada (tridimensional), de forma que aunque los aminoácidos aparezcan separados en la secuencia, se aproximan cuando el polipéptido se dobla. De otro lado, estos péptidos podrían ser apropiados para la inducción de linfocitos T que reconocen péptidos lineales cortos que se unen al complejo mayor de histocompatibilidad o CMH. Algunos de ellos incluso son altamente conservados entre cepas de virus y por lo tanto inducen una respuesta cruzada de células T.

### **Vacunas de DNA**

Para sorpresa de los inmunólogos, se descubrió que la inoculación intramuscular de DNA viral clonado en un plásmido con los promotores apropiados podría producir respuestas inmunes humorales y celulares de larga duración, dirigidas contra la proteína codificada por el DNA plasmídico. De la misma forma se viene

probando el efecto inmuno-estimulador de los genes de varias citoquinas también insertados en el plásmido, para la potenciación de la respuesta inmune local. En este sentido se desconocen, sin embargo, respuestas tan básicas como el destino de los plásmidos inyectados, su persistencia, los mecanismos de expresión incluyendo el procesamiento de los péptidos a través de las vías citosólica y endosomal y la presentación antigénica a través del CMH clase I y II para linfocitos citotóxicos y ayudadores respectivamente. Por sobre todas las cosas, antes de la utilización de este método en poblaciones humanas se requerirá de evidencia fehaciente de la no integración del material genético foráneo dentro del genoma del hospedero, lo cual podría conducir a cáncer.

### **Cápsides Vacías (“Virus- like” particles o VLPs)**

Dentro de los sistemas más novedosos de vacunas antivirales se deben mencionar estas estructuras formadas de manera espontánea durante el ciclo de replicación de algunos de los agentes de simetría icosaédrica, tales los papiloma y los parvovirus. Estas cápsides vacías son una forma de cáscaras huecas compuestas sólo de proteínas estructurales que no poseen ningún tipo de material genético, por lo que representan vacunas naturales ideales, puesto que no acarrearán ningún riesgo de reversión genética. Las VLPs de los papilomavirus han demostrado ser altamente inmunogénicas, por lo que en actualidad se les está empleando en ensayos clínicos de fase II para el control de los papilomavirus asociados al cáncer cervical en la mujer (PVH 16 y 18). Por otro lado, estos VLPs han sido también empleados como instrumentos invaluable para la visualización de los eventos relacionados con la infección del parvovirus canino.

### **La revolución verde**

La transferencia de genes mediada por *Agrobacterium tumefaciens* al interior del genoma de las plantas, ha desarrollado el escenario para nuevos procedimientos que ayudan al mejoramiento de las cosechas, incluyendo la resistencia a los patógenos, el incremento de la productividad, la modificación en el contenido de aceite de las plantas y la resistencia a condiciones de estrés medioambientales. Los nuevos desarrollos en la virología molecular de plantas han conducido a la generación de sistemas basados en

plantas para la expresión transitoria de secuencias foráneas usando vectores virales de plantas. En la última década, los vectores virales de plantas y las plantas transgénicas, han sido usados más y más para producir una gran cantidad de reactivos biomédicos incluyendo antígenos para vacunas, de una manera económicamente factible y segura. Estas nuevas tecnologías basadas en las plantas tienen un enorme potencial para una variedad de aplicaciones incluyendo la administración oral de antígenos vacunales.

### **Vacunas con base en la ingeniería genética reversa**

Para terminar, vale la pena mencionar uno de los descubrimientos más importantes e innovadores en materia de estudios genéticos de los virus, en particular de aquellos que poseen RNA de polaridad negativa. Desde los albores de la identificación de la genética viral se identificó la capacidad de aquellos que contenían RNA de polaridad positiva, y por lo tanto eran reconocidos como RNA mensajeros, es decir que poseían la capacidad de transcribirse inmediatamente ingresaban a la célula hospedera. De tal manera que con sólo ser transfectados (o transferidos) al citoplasma podrían dar lugar a la partícula infecciosa completa, en otras palabras, se consideraban RNA infecciosos. En el otro lado del espectro estaban aquellos virus que por poseer RNA de sentido negativo, deberían en primer lugar, portar su propia polimerasa para cambiar de polaridad y en segundo lugar sólo se replicaban estando en forma de nucleoproteína. Ahora bien, con el desarrollo de la biología molecular ha sido posible establecer sistemas vectoriales de clonación y expresión del material genético viral, de tal manera que al transfectar todos los plásmidos que portan la información viral (en DNA copia) correspondiente a la información genética y proteínas necesarias para la replicación del virus, dicho sistema produce virus nuevos. De esta forma, adelantándose a los posibles cambios genéticos que la naturaleza pudiese brindarle, para estudiar el efecto de dicha mutación sobre el fenotipo del agente, el investigador del presente que usa esta tecnología es capaz de inducir cambios genéticos y caracterizar el papel que dicho gen, juega en el ciclo de vida del agente.

Utilizando esta tecnología ha sido posible estudiar y rastrear los cambios que condujeron a la presentación de una epidemia de influenza aviar con posibles repercusiones en la salud pública en China, desarrollar

virus de influenza con capacidad vectorial para portar genes adicionales de otros agentes virales, estudiar las funciones de cada uno de sus genes y proteínas, y potencialmente en un futuro cercano producir vacunas más seguras y efectivas para el control de agentes tan perjudiciales como el virus de la Estomatitis Vesicular y tan temidos como el virus del Ébola.

### **Métodos para potenciar la respuesta inmune**

En todos los casos de vacunas inactivadas y especialmente en los de proteínas purificadas y sintéticas, el uso de inmuno-moduladores se considera una medida esencial para la inducción de una respuesta protectora adecuada. En este sentido, los adyuvantes han sido invaluable como sustancias que cuando son mezcladas con vacunas potencian la respuesta inmune humoral o celular, de manera que menores dosis del antígeno sean necesarias para la vacunación. Los adyuvantes difieren notablemente en su química y su modo de acción, el cual puede involucrar la prolongación del tiempo del antígeno inoculado, la activación de macrófagos que conduce a la secreción de citoquinas y la quimiotaxis de linfocitos y la mitogenicidad de los linfocitos. El hidróxido de aluminio es el único adyuvante permitido en vacunas humanas y se ha usado por muchos años aunque no es particularmente efectivo. Los adyuvantes de aceite mineral (Freunds) son demasiado fuertes para ser aceptados en humanos. Existe una clara necesidad de nuevos y mejores adyuvantes y en este sentido existe experimentación con el Muramyl dipéptido que se puede acoplar a antígenos sintéticos o incorporado en liposomas. Estos últimos son membranas lipídicas esféricas artificiales dentro de las que se pueden empacar proteínas. De este estilo son los llamados virosomas (o inmunosomas). Los virosomas son estructuras parecidas a las envolturas virales que carecen de ácido nucleico u otros componentes virales y pueden incorporar sustancias con capacidad adyuvante. Un ejemplo de éste es el virosoma del virus H1N1 de la influenza, originado a partir del serotipo A/Singapur/6/86, que es utilizado para transportar péptidos capaces de inducir respuestas de tipo celular (T CD8+); mientras péptidos adheridos a la superficie pueden inducir anticuerpos.

Finalmente, los complejos inmuno-estimuladores también llamados *iscoms* (immunostimulating complexes) han mostrado gran capacidad inmunopotenciadora en forma experimental pero aun no han sido desarrollados para vacunas comerciales.

## Epílogo

Como podemos ver, la vacunología sigue siendo un campo de mucho futuro y grandes expectativas, si bien

las realidades de estas nuevas aplicaciones requieren aún mucha afinación y los correspondientes ensayos clínicos que garanticen la eficacia y seguridad de su aplicación masiva.

## Bibliografía

- Boisgerault F, Moron G, Leclerc C. 2002. Virus-like particles: a new family of delivery systems. *Expert Rev Vaccines* 1(1):101-9.
- Flint SJ, Enquist L, Racaniello KM, Skalka AM. 2004. *Principles of virology*. 2<sup>nd</sup> ed. Ed ASM press, Washington D.C. 918 p.
- Frank Fenner, White DO. 1994. *Medical Virology*. Academic press, 603 p.
- Koprowski H, Yusibov V. 2001. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 19(17-19):2735-41
- Rodas JD. 2000. Fronteras en patogénesis y manipulación genética de las infecciones virales. En: *Principios de virología*. Editor Jorge Ossa. 3a. Ed. Pp:115-128
- Rodas JD. 2002. Virus emergentes e instrumentos para su estudio molecular. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 15(3): 342-355.
- Westerfeld N, Zurbriggen R. 2005. Peptides delivered by immunostimulating reconstituted influenza virosomes. *J Pept Sci*.