

Nuevas formas de creación de vacunas: tecnología del ADN recombinante

J. Santos Aguado

Division of Tumor Virology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston.

INTRODUCCION

Los avances en biología molecular durante estos últimos años están siendo de gran ayuda en el estudio de las bases moleculares de la antigenicidad. La utilización de las técnicas de Ingeniería Genética^{1,2} ha permitido la clonación del ADN de diversos organismos patógenos (bacterias, virus, etc.) en vectores, así como la introducción de estas nuevas moléculas recombinantes en distintos tipos de células (eucariotas y procariotas), donde al ser procesados por los mismos mecanismos que los genes de la célula huésped que los alberga, son detectados en la superficie de dichas células. Esto ha supuesto las bases para su aplicación en la producción de sustancias biológicamente activas.

Las vacunas actualmente en uso no son las ideales, bien por su elevado coste de producción (vacunas contra la hepatitis B o rabia), por sus potenciales efectos tóxicos o virulentos (*pertussis* o rubéola) o por la inadecuada protección que aportan (cólera o tífus); es por ello, por lo que se está investigando una nueva generación de vacunas (péptidos sintéticos, virus recombinantes híbridos y atenuados, antígenos sintetizados químicamente, etc.) con el objetivo de elaborar un nuevo tipo de vacuna que carezca de los efectos desfavorables, anteriormente mencionados.

Atendiendo a su capacidad de reproducción en el organismo, las vacunas se han clasificado en:

Vivas (vacunas de virus vivos modificados)

Son cepas atenuadas de virus virulentos, producidas al pasarlas sucesivamente en células de especies diferentes de su huésped natural. En este proceso se producen diversas mutaciones que conllevan una disminución de su virulencia al afectar la reproducción del virus en el huésped. El mayor problema de este tipo de vacunas es su posibilidad de reversión, lo que originaría un virus nuevamente virulento.

Existen también virus no patógenos que presentan una reactividad inmunológica cruzada (como es el caso de los poxavirus y la viruela).

El objetivo para diseñar una vacuna vírica viva supone la eliminación de los factores críticos para la virulencia, pero, al mismo tiempo, manteniendo intacta la capacidad para inducir una respuesta inmunológica: producción de anticuerpos neutralizantes del virus, estimulación de diversas células citotóxicas (CTL, NK, etc.), interferón y otros moduladores de la respuesta inmune. La utilización de la tecnología de recombinación del ADN en este campo se podría concretar en:

1. El estudio de los diversos patógenos y de su estructura molecular ayudará a la mutagenización de regiones específicas responsables de los efectos virulentos, creándose nuevas cepas mutantes incapaces de revertir.

2. Creación de moléculas híbridas utilizando un vector no patógeno y cuya expresión resulte en la creación de inmunidad en el huésped (ver más adelante).

Vacunas inactivadas o no infecciosas

Estas son, en general, más estables y seguras, pero requieren habitualmente una dosis más alta de antígeno, administrada por vía parenteral, lo que puede originar reacciones de hipersensibilidad.

La base de este tipo de vacunas consiste en la identificación del (los) determinante(s) antigénico(s) que origina los anticuerpos destinados a su neutralización, ya que la unión de ambos previene la absorción por la célula e infección subsiguiente. La caracterización de estos antígenos (responsables de la absorción celular y de la inducción de anticuerpos neutralizantes) permitirá su elaboración sintética (péptidos sintéticos).

La producción de una vacuna superior a las existentes en la actualidad tiene que cumplir dos requisitos: a) el producto tiene que ser expresado en grandes cantidades, con objeto de facilitar su purificación y administración, y b) este

Correspondencia y solicitud de separatas: J. Santos Aguado, Dana-Farber Cancer Institute, Tumor Virology R928, 44 Binney St. Boston MA 02115, USA.

producto tiene que ser efectivo en profilaxis, careciendo de efectos colaterales.

ESTADO ACTUAL

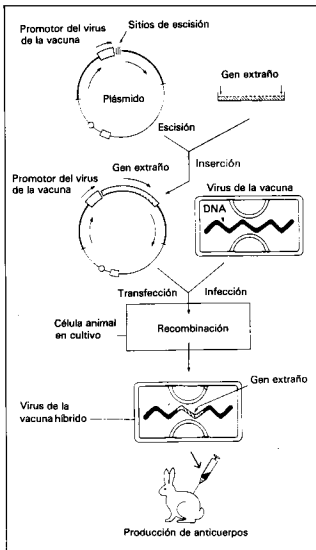
La expresión de genes clonados requiere una compatibilidad tanto genética como bioquímica, ya que aunque el código genético es el mismo, las señales que controlan su transcripción, procesamiento y posterior traducción, varían según el tipo de organismo.

Varios sistemas han sido utilizados durante estos últimos años en la producción de sustancias con un interés biomédico: bacterias como *E. coli*³ o levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*⁴; en este último caso se ha demostrado su utilidad y ausencia de efectos secundarios en los estudios clínicos realizados en voluntarios^{5,6}. Estos sistemas presentan, sin embargo, la desventaja de que sus productos deben ser purificados de la célula huésped antes de poder ser utilizados; existen además, problemas de incompatibilidad para su uso entre especies distintas³; es por ello por lo que recientemente se ha hecho un esfuerzo en la producción de estas sustancias por células de mamíferos, lo que constituye una nueva generación de vacunas vivas.

Han pasado casi 200 años desde que Edward Jenner⁷ demostró que la inoculación con virus vivos (poxavirus del género *Vaccinia*) procedentes del ganado, proporcionaba inmunidad contra la viruela en la especie humana, basándose en la observación (durante una epidemia de dicha enfermedad) de su ausencia en trabajadores en contacto con el ganado. Hoy día estos virus están siendo manipulados genéticamente *in vitro* y utilizados como vectores para la introducción de determinados antígenos en las células, de forma que su expresión desencadene una respuesta inmunológica.

Se están utilizando diversos métodos para introducir material genético de origen diverso en células: microinyección⁸, fusión de liposomas que contienen ADN⁹, introducción directa del ADN pre-

Fig. 1. El gen que codifica un antígeno determinado, es clonado en un plásmido e introducido en un cultivo celular donde, mediante un fenómeno de recombinación homóloga, se producirá el virus recombinante que será utilizado como vacuna. Con permiso de B. Moss (Science News, junio 1985).



cipitado con ortofosfato cálcico¹⁰, retrovirus¹¹ y otros vectores eucarióticos víricos¹².

Entre estos últimos son de gran interés los poxavirus (virus del género *Vaccinia*), ya que a diferencia de otros potenciales vectores (Simian Virus 40, herpes¹³, adenovirus¹⁴, retrovirus o papiloma) tiene la ventaja (además de no ser virulento) de no ser considerado oncogénico, por lo que su utilización presenta en principio un riesgo menor (aunque hay que considerar las complicaciones que han sido descritas como consecuencia de la vacunación¹⁵).

La base de este nuevo sistema consiste en escoger y clonar un componente en el agente patógeno

causante de la enfermedad, capaz de desencadenar una respuesta inmune específica contra él (determinante antigénico); este segmento de ADN es insertado en el genoma del *Vaccinia* de forma que cuando una persona o animal es inoculado con este virus recombinante y se produce la infección local, la replicación del virus en la célula huésped provocará una respuesta inmune mixta contra el *Vaccinia* y contra el microorganismo incluido en él.

Su utilización como vectores ha tenido que resolver diversos problemas técnicos: en primer lugar, el ADN extraño tiene que ser introducido en un lugar que no altere los mecanismos de replicación y

mantenimiento del propio virus en las células; es importante conseguir una eficiente expresión y por último es necesario un método que nos permita seleccionar los virus recombinantes (virus que contienen el material extraño integrado). Esto se ha conseguido solucionar de la siguiente forma (fig. 1): se han construido diversos plásmidos que contienen: un segmento del virus (no necesario para su replicación), el gen que codifica la enzima timidincinasa (TC) del virus del herpes (HSV-TC) y diversos lugares únicos de restricción que permitan la introducción del ADN extraño. Mediante la técnica del fósforo cálcico, esta «quimera» es introducida en células previamente infectadas con el virus, con objeto de conseguir que mediante un fenómeno de recombinación *in vivo*, entre las secuencias homólogas del virus, el ADN extraño sea integrado, empaquetado y expresado como una partícula vírica.

Existen dos formas de seleccionar las células que albergan estos virus recombinantes, una consiste en la clonación del ADN extraño en el gen TC del virus, seleccionándose las células por su fenotipo TC: mediante la utilización del compuesto 5-bromodeoxiuridina (el fenómeno de recombinación homóloga ocurrirá en dicho gen, interrumpiéndose su secuencia por el ADN extraño, por lo que las células serán incapaces de sintetizar dicha enzima)¹⁶, el otro tipo de selección se basa en añadir el gen HSV-TC en células mutantes TC, la recombinación *in vivo* incorporará dicho gen que será detectado mediante hibridación con segmentos radiactivos, selección del medio de cultivo o mediante determinación enzimática (fosforilación de 5-¹²⁵I-2'-deoxiciditina)¹⁷.

En resumen, la construcción de estos virus genéticamente manipulados requiere 3 pasos:

1. Selección y preparación del gen extraño: esto supone la identificación y aislamiento del componente del agente patógeno capaz de producir anticuerpos protectores contra su infección; en el caso de infecciones víricas, estos antígenos

están localizados generalmente en su superficie.

2. La construcción del virus recombinante, su introducción en células en las que por un mecanismo de recombinación el segmento extraño es introducido en el genoma del virus, integrándose de forma que sea empaquetado como una partícula vírica.

3. Introducción de esta molécula recombinante en el huésped, donde el gen extraño (al igual que el propio *Vaccinia*) dirige su propia síntesis de proteínas, que son procesadas, glucosiladas e insertadas en la membrana, como las pertenecientes a la célula huésped, siendo además capaces de desencadenar una respuesta inmune específica contra ellas.

Hasta ahora, este método ha sido utilizado para la expresión de varios antígenos: hemaglutinina del virus *influenza*¹⁸, antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg)¹⁹, glucoproteína D del herpes simple²⁰, antígeno de superficie del esporozoito del *Plasmodium knowlesi*²¹, glucoproteína del virus de la rabia²², etc.; se ha demostrado además, que estas moléculas (en la superficie) son idénticas a las moléculas originales, manteniendo su capacidad antigénica y estimulando tanto la síntesis de anticuerpos específicos contra ellas (de forma que la introducción de estos virus recombinantes confiere inmunidad al exponer dichos animales al virus original), como una respuesta citotóxica específica frente a las células que expresan dichos productos^{23,24}. Su utilización abre un gran campo, tanto en la vacunación humana como en la del ganado²⁵.

Por otro lado, el gran tamaño del genoma del virus *Vaccinia* (180 Kb) permite la inserción de una gran cantidad de ADN extraño (hasta 30 Kb)²⁶, lo que ha sugerido la posibilidad de construir una vacuna polivalente; así por ejemplo, un virus recombinante ha sido construido conteniendo las secuencias que codifican 3 antígenos distintos: el antígeno de superficie de la hepatitis B (HbsAg), la glucoproteína D del virus del herpes simple y la hemaglutinina del virus

influenza; produciéndose una respuesta inmunológica específica (primaria y secundaria) frente a dichos antígenos, en conejos inoculados intravenosa o intradérmicamente con este virus recombinante polivalente²⁷.

Otras enfermedades que han sido estudiadas durante estos últimos años, con la ayuda de estas técnicas y con el objetivo de elaborar una vacuna contra ellas son:

1. Paludismo: La importancia que el desarrollo de una vacuna efectiva contra esta enfermedad tiene, viene derivada de los 200 millones de personas que se consideran afectas por la enfermedad (según datos de la OMS), así como los 2 millones que se calculan mueren cada año, por lo general en países en vías de desarrollo (siendo en su mayoría mortalidad infantil), a consecuencia de la misma.

La resistencia tanto del mosquito a los insecticidas empleados (DDT), como del *Plasmodium* a la cloroquina (fenómeno que empezó en Asia y que se ha extendido en los últimos años por Latinoamérica y África)²⁸ ha supuesto el resurgimiento de la enfermedad destruyéndose el optimismo generado hace unas décadas, cuando fue erradicada de diversos países.

Los estudios durante estos últimos años se han centrado en las proteínas de superficie del parásito, por ser éstas específicas de cada estadio celular, y por otro lado estos antígenos de superficie son los que se suponen implicados en el desencadenamiento de la respuesta inmune por el huésped. El conocimiento de la estructura de estos genes²⁹⁻³¹, así como el estudio de su diversidad³² ha facilitado su clonación y expresión en *E. coli*³³, lo que ha abierto nuevas perspectivas en su utilización posterior. Es interesante señalar, no obstante, los problemas políticos y económicos que han surgido en la búsqueda de una vacuna efectiva³⁴.

2. Cólera: La determinación de la secuencia de nucleótidos y análisis delecionesales del operón de la toxina ha permitido el estudio e identificación de las secuencias reguladoras de la transcripción y tra-

ducción, permitiendo crear cepas atenuadas pero capaces de producir una respuesta inmune^{35, 36}.

3. Otras enfermedades incluyen: esquistosomiasis³⁷, poliomielitis³⁸ y lepra^{39, 40} entre otras.

En último lugar, es interesante mencionar los esfuerzos que se están realizando en la manipulación genética para la construcción de anticuerpos específicos, con objeto de crear nuevas moléculas de inmunoglobulinas⁴¹ y conseguir su expresión en bacterias⁴² o en células plasmáticas. De esta forma, utilizando los genes que codifican un anticuerpo contra el hapteno azofenilarsonato, la región variable de una cadena pesada fue unida a la región constante de una cadena ligera K (VhCk); esta «quimera» fue introducida en una mieloma, produciéndose un sobrenadante con capacidad de unirse al antígeno⁴³.

RESUMEN

En esta revisión se han intentado exponer brevemente los últimos avances y aportaciones que el desarrollo de la denominada "Tecnología de recombinación del ADN" ha supuesto para la producción de substancias biológicamente activas y en concreto para la creación de vacunas. La utilización de vacunas recombinantes, como las descritas en el caso del virus *Vaccinia*, tiene potencialmente grandes ventajas sobre las vacunas actualmente en uso, ya que el virus es sencillo y económico de manipular en cultivo, siendo además posible su conservación en polvo sin necesidad de refrigerar y de fácil administración. Esto último tiene gran utilidad en países en vías de desarrollo. Por otro lado, su gran tamaño hace posible la elaboración de vacunas polivalentes. Su utilización, sin embargo, depende todavía de varios factores; en primer lugar son necesarios más estudios para determinar el grado de protección y duración de la inmunidad que estos virus recombinantes confieren; asimismo es necesario evaluar la seguridad en su administración y la ausencia de efectos desfavorables.

Bibliografía

1. Engberg NC, Eisenstein BJ. The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases. *N Engl J Med* 1984; 311:892-901.
2. Murray J. DNA in Medicine: new routes to drugs, diagnostics agents and vaccines. *Lancet* 1984; 2:1 194-1198.
3. Mackay P, Pasek M, Magazin M et al. Production of immunologically active surface antigens of hepatitis B virus by *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:4.510-4.514.
4. McAleer WJ, Buynak EB, Maigetter RZ, Wampler DE, Miller WJ, Hilleman MR. Human hepatitis B Vaccine from recombinant yeast. *Nature*. 1984; 307:178-180.
5. Scolnick EM, McLean AA, West DJ et al. Clinical evaluation in healthy adults of a hepatitis B Vaccine made by recombinant DNA. *JAMA* 1984; 251:2.812-2.815.
6. Jilg W, Schmidt M, Zoulek G, Lorbeer B, Wilske B, Deinhardt F. Clinical evaluation of a recombinant hepatitis B Vaccine. *Lancet* 1984; 2:1.174-1.175.
7. Jenner E. An inquiry into the causes and effects of the variolae *Vaccinae*, a disease discovered in some of the Western counties of England. Particularly Gloucestershire, and known by the name of the Cow Pox. Londres, Sampson Low, 1978.
8. Mueller C. Mapping of early SV40-specific functions by microinjection of different early viral DNA fragments. *Cell* 1978; 15:579-585.
9. Dimitriadis GJ. Traslation of rabbit globin mRNA introduced by liposomes into mouse lymphocytes. *Nature* 1978; 274:923-924.
10. Wigler M, Silverstein S, Lee L, Pellicer A, Cheng Y, Axel R. Transfer of purified herpes virus thymidine kinase gene to cultured mouse cells. *Cell* 1977; 11:223-232.
11. Williams DA, Lemischka IR, Nathan DG, Mulligan RC. Introduction of new genetic material into pluripotent haematopoietic stem cells of the mouse. *Nature* 1984; 310:476-480.
12. Rigby PJW. Cloning vectors derived from animal viruses. *J Gen Virol* 1983; 64:255-266.
13. Shih MF, Arsenakis M, Tiollais P, Roizman B. Expression of hepatitis B virus S gene by herpes simplex virus type I vectors carrying alpha- and beta-regulated gene chimeras. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:5.867-5.870.
14. Davis AR, Kostek B, Mason BB et al. Expression of hepatitis B surface antigen with a recombinant adenovi-

- rus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:7.560-7.564.
15. Lane JM, Ruben FL, Neff JM, Millar JD. Complications of smallpox vaccination. *N Engl J Med* 1969; 281:1.201-1.208.
16. Mackett M, Smith GL, Moss B. General method for production and selection of infectious *Vaccinia* virus recombinants expressing foreign genes. *J Virol* 1984; 49:857-864.
17. Panicali D, Paoletti E. Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious *Vaccinia* virus. *Proc Natl Acad Sci* 1982; 79:4.927-4.931.
18. Panicali D, Davis SW, Weinberg RL, Paoletti E. Construction of live vaccines by using genetically engineered poxviruses: Biological activity of recombinant *Vaccinia* virus expressing influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:5.364-5.368.
19. Smith GL, Mackett M, Moss B. Infectious *Vaccinia* virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigens. *Nature* 1983; 302:490-495.
20. Paoletti E, Lipinskas BR, Samsonoff C, Panicali D. Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of *Vaccinia* virus recombinants expressing the hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:193-197.
21. Smith GL, Godson GN, Nussenzeiw V, Nussenzeiw RS, Barnwell J, Moss B. *Plasmodium knowlesi* sporozoite antigen: expression by infectious recombinant *Vaccinia* virus. *Science* 1984; 224:397-399.
22. Wiktor TJ, MacFarlan RI, Reagan KI et al. Protection from rabies by a *Vaccinia* virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:7.194-7.198.
23. Bennink JR, Yewdell JW, Smith GL, Moller C, Moss B. Recombinant *Vaccinia* virus primes and stimulates influenza hemagglutinin-specific cytotoxic T cells. *Nature* 1984; 311: 578-579.
24. Yewdell JW, Bennink JR, Smith GL, Moss B. *Influenza* A virus nucleoprotein is a major target antigen for cross-reactive anti-influenza A virus cytotoxic T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:1.785-1.789.
25. Mackett M, Yilma T, Rose JK, Moss B. *Vaccinia* virus recombinants: expression of VSV genes and protecti-

- ve immunization of mice and cattle. Science 1985; 227:433-435.
26. Smith GL, Moss B. Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25000 base pairs of foreign DNA. Gene 1983; 25:21-28.
27. Perkus ME, Piccini A, Lipinskas BR, Paoletti E. Recombinant Vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. Science 1985; 229:981-984.
28. Nigel Godson G. Molecular approaches to malaria vaccines. Sci Am 1985; 252:52-59.
29. Dame JB, Williams JL, McCutchan TF et al. Structure of the gene encoding the immunodominant surface antigen on the sporozoite of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science 1984; 225:593-630.
30. Cowman AF, Saint RB, Coppel RL, Brown GV, Anders RF, Kemp DI. Conserved sequences flank variable tandem repeats in two S-antigen genes of *Plasmodium falciparum*. Cell 1985; 40:775-783.
31. Stahl HD, Crewther PE, Anders RF et al. Interspersed blocks of repetitive and charged aminoacids in a dominant immunogen of *Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci USA 1985; 82:543-547.
32. Hommel M. Antigenic variation in malaria parasites. Immunol Today 1985; 6:28-33.
33. Hope IA, Mackan M, Hyde JE, Goman M, Scaife J. The gene for an exported antigen of the malaria parasite *Plasmodium falciparum* cloned and expressed in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Res 1985; 13:369-379.
34. Newmark P. What a chance a malaria vaccine? Nature 1983; 302:473.
35. Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GD, Harford N, Groyne F, Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. Nature 1983; 306:551-557.
36. Kaper JB. Recombinant nontoxicogenic *Vibrio cholerae* strains as attenuated cholera vaccine candidates. Nature 1984; 308:655-658.
37. Taylor DW, Cordingley JS, Butterworth AE. Genetic engineering and schistosome vaccine. Vet Parasitol 1984; 14:285-298.
38. Evans DMA, Dunn G, Minor PD et al. Increased neurovirulence associated with a single nucleotide change in a noncoding region on the Sabin type 3 poliovaccine genome. Nature 1985; 314:548-550.
39. Young RA, Mehra V, Sweetser A et al. Genes for the major protein antigens of the leprosy parasite *Mycobacterium leprae*. Nature 1985; 316:450-452.
40. Mustafa AS, Gill HK, Nerland A et al. Human T cell clones recognize a major *M. leprae* protein antigen expressed in *E. Coli*. Nature 1986; 319:63-66.
41. Boss MA, Wood CR. Genetically engineered antibodies. Immunol Today 1985; 6:12-13.
42. Boss MA, Kenten JH, Wood CR, Erntage JS. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesized in *E. Coli*. Nucl Acids Res 1984; 12:3.791-3.806.
43. Sharon J, Gelter ML, Manser T, et al. Expression of a VHCK chimaeric protein in mouse myeloma cells. Nature 1984; 309:364-367.