

### **Inmunización genética: vacunas de ADN**

A mediados de este siglo, el descubrimiento de la doble hélice situó a la molécula del ADN en el epicentro de una revolución biológica que produjo, entre otros cambios notables, el nacimiento de la biología molecular y ligada a ésta una nueva tecnología de valiosos alcances: la ingeniería genética.

Nuevamente es el ADN y su aplicación como vehículo inmunizante, el hallazgo que sacude a la comunidad científica. Esta vez se trata de un ADN bacteriano en forma de círculo enrollado, un plásmido, debidamente diseñado de modo de portar un gen elegido y una batería de elementos genéticos para asegurar su expresión, el que constituye una esperanza para inmunizar contra infecciones producidas por bacterias, virus, parásitos, el cáncer, y otras afecciones de naturaleza alérgica que depauperizan la calidad de vida y para las que no se han podido obtener vacunas tradicionales.

La tecnología de fabricar vacunas con plásmidos surgió por azar a fines de los años 80. Con el objeto de lograr mayores avances en terapia génica, Wolff y col.<sup>1</sup> buscaban un tipo de formulación lipídica que permitiera introducir genes en las células con una eficacia superior a la conocida. Realizaban los experimentos inyectando, en el músculo esquelético de ratones, un plásmido que llevaba insertado un gen cuya expresión resultaba fácil de detectar como por ejemplo, el gen de la enzima  $\beta$ -galactosidasa, cuya presencia puede revelarse en los cortes histológicos de los músculos transfectados por incubación con un sustrato coloreado. Analizando los resultados obtenidos en estos experimentos efectuados in-vivo se dieron cuenta que el nivel de la expresión génica en el músculo esquelético era comparable a una transfección de células en cultivo y que, además, el ADN desnudo que había sido usado como control mostraba expresiones génicas similares o mayores que las formulaciones lipídicas, pudiendo detectarse hasta 100 ngr de proteína/gr de músculo. Este descubrimiento alertó inmediatamente a grupos de investigación de universidades y laboratorios comerciales de los Estados Unidos interesados en la obtención de vacunas y, ya en 1992, aparecen dos trabajos fundacionales como el de Tang y col.<sup>2</sup> en el que se demuestra que el bombardeo del músculo esquelético de ratones con balas de oro recubiertas de ADN resulta en la expresión del antígeno del gen extraño que porta el ADN, siendo este antígeno capaz de estimular una respuesta de anticuerpos. El otro trabajo versó sobre protección contra virus Influenza A in vivo y fue presentado en la reunión anual de Cold Spring Harbor, dedicada a Vacunas, por Margaret Liu, Merck Inc, y sus colaboradores de Vical Inc<sup>3</sup>, empresas dedicadas activamente a la producción de vacunas ADN. Mediante tres inoculaciones intramusculares, conteniendo cada una 100  $\mu$ g de ADN portando el gen de la hemaglutinina, efectuadas en un período de seis semanas lograron una respuesta inmune óptima tanto humoral como celular. Inmediatamente después de estas publicaciones se produjo una avalancha de trabajos incluida la creación de una Web en Internet<sup>4</sup> dedicada a proveer información sobre este tipo de vacunas, muy recomendable para ser consultada por toda persona interesada en el tema.

De acuerdo con las publicaciones aparecidas hasta una fecha muy reciente, se han realizado experiencias con las bacterias *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pulmonis* y la toxina tetánica. Mientras que en el campo de los parásitos se ha experimentado con *Leishmania major*, *Schistosoma japonicum*, *Toxoplasma gondii* y el *Plasmodium yoelii*, agente de la malaria. El listado de los virus estudiados es numéricamente muy superior, sobre todo porque para proteger contra una determinada virosis se utilizaron mayormente diferentes polipéptidos virales, aunque en general las proteínas constitutivas de envoltura o de la cápside, que son las más expuestas al medio ambiente, son

las de elección. Hay información sobre virus de la diarrea bovina, herpes bovino, herpes simplex, encefalitis de Saint Louis, citomegalovirus, hepatitis B, hepatitis C, enfermedad de Newcastle, coriomeningitis linfocítica, sarampión, papiloma, rabia, influenza, herpesvirus suis, rotavirus, virus de la inmunodeficiencia felina, virus de la inmunodeficiencia del simio, el virus HIV y aunque estrictamente no se trate de un virus, contra la proteína prión. El mayor número de publicaciones se han realizado con el virus de hepatitis B, el virus de influenza y el HIV utilizando no sólo modelos animales ya que, actualmente, se están realizando ensayos clínicos en humanos. Nótese que en sólo siete años se ha pasado de la experimentación a la clínica. Así por ejemplo, se están llevando a cabo tres estudios con HIV, dos de carácter terapéutico en los que han probado la glicoproteína gp 160 y/o los genes gal/pol respectivamente, mientras que otro de carácter profiláctico incluye en el ADN a la gp 160 solamente. Asimismo se están evaluando estudios clínicos contra herpes, influenza, hepatitis B y carcinoma<sup>5</sup>.

¿Qué es la vacunación con ADN o más apropiadamente la inmunización mediada por ADN? Es la introducción directa de ADN plasmídico en una célula, por medio de inyección con una aguja o por bombardeo con partículas de oro recubiertas del ADN en cuestión, que puede lograr la expresión de una proteína antigénica dentro de la célula transfectada.

Un vector típico incluye varios elementos genéticos requeridos para lograr la expresión intracelular del gen extraño insertado. En una reunión internacional realizada en Bethesda, Estados Unidos, en febrero de 1996, se pudo conocer que tanto fabricantes como investigadores utilizan un diseño de plásmido similar que podríamos considerar prototipo<sup>3</sup>. Si imaginamos el plásmido como un círculo y situamos el gen que se desea expresar a las seis menos cuarto, encontramos antes de esta secuencia a un gen promotor obtenido del citomegalovirus (CMV), que a su vez está separado del gen problema por una secuencia llamada intrón A que también corresponde al promotor del CMV. Frecuentemente, esta secuencia suele estar unida al gen activador del plasminógeno tisular que permite controlar la secreción del gen recombinante. También se debe considerar la inserción de una caja TATA para permitir la unión de la ARN polimerasa. En el otro extremo del gen problema se inserta una secuencia poli A obtenida del virus SV40 o de la hormona de crecimiento bovina. Se entiende que lo fundamental de esta construcción es la elección del gen problema que, para cualquier infección, ha de ser el gen que codifica al antígeno responsable de inducir una respuesta inmune protectora. El plásmido debe contener además otros elementos, entre ellos el origen de su propia replicación que le permite ser amplificado en numerosas copias dentro de una bacteria y un gen de expresión de un antibiótico, como por ejemplo la kanamicina, que va a permitir seleccionar las colonias de *E. coli* transformadas por el plásmido. Además, suele agregarse también el gen de la  $\beta$ -galactosidasa o de otra enzima que permita comprobar que una vez transfectado el ADN hay expresión del mismo.

Para sintetizar ¿cómo se prepara una vacuna ADN?: se amplifica un plásmido recombinado en la bacteria *E. coli*, luego se lo purifica lisando las células y aplicando el material a un gradiente de cloruro de cesio seguido de extracción fenólica, luego se disuelve en solución buffer-salina fosfato y a veces se inyecta usando además, por ejemplo, cardiotoxina con el objeto de lograr dañar el músculo. En general, el ADN se administra sólo en concentraciones que varían de 1 a 100  $\mu$ gr por dosis, las que se repiten entre 5 a 10 veces utilizando la vía intramuscular o intradérmica preferentemente. Pero, algunos investigadores prefieren inyectar junto con la vacuna otro plásmido conteniendo el gen del factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos que potencia la respuesta inmune.

La inmunización genética tiene varias ventajas sobre las vacunas tradicionales y, por el momento, ninguna desventaja aparente, ya que los vectores plasmídicos se construyen rápidamente y con facilidad. El clonado del gen en un vector comercial con un sitio apto para clonado múltiple y el testado de su expresión en una transfección se logra en una semana.<sup>7</sup> Por otra parte, el ADN circular se puede hervir, precipitar con alcohol y ser enviado en un sobre por correo. Pero todavía más importante es su

gran estabilidad térmica, propiedad muy valorada para los países en desarrollo en los que es difícil mantener la cadena de frío necesaria para conservar la potencia de una vacuna atenuada. Si se comparan entre sí las ventajas y desventajas de todos los tipos de vacunas conocidas, las fabricadas con ADN compiten exitosamente con las atenuadas, con la posibilidad además de que pueden administrarse juntos varios plásmidos que inmunicen contra diferentes microorganismos. Las preocupaciones por su uso, por el momento, son teóricas y se refieren a la posibilidad de integración del plásmido o a una excesiva respuesta inmune inflamatoria, ya que se ha observado que la expresión del antígeno se mantiene por tiempo muy prolongado.

Se ha probado reiteradamente que la inmunización génica genera hacia el antígeno, expresado en la superficie de la célula en asociación con el complejo de histocompatibilidad tipo I, todo el espectro de la respuesta inmune incluyendo anticuerpos, células T colaboradoras y células T citolíticas. Inicialmente se pensó que la respuesta era del tipo Th1, pero por estudios posteriores realizados con el sistema del virus de rabia<sup>7</sup> se llegó a la conclusión de que se trata de una respuesta mixta Th0. Sin embargo, lo que no está aclarado aún es el mecanismo preciso de cómo se inicia esa respuesta inmune tan efectiva, por lo que se ha abierto así un nuevo campo de interés teórico para explicar los mecanismos inmunes de las células musculares y las de la piel, que hasta el presente son desconocidos.

Si reflexionamos sobre los resultados obtenidos con este nuevo enfoque experimental nacido en el campo de la Vacunología, parece ser tan revolucionario como lo fuera en su oportunidad la experiencia realizada por Jenner al utilizar el virus cowpox para vacunar contra el virus de viruela en 1796. Ambos hechos tienen además en común el carácter experimental no teórico de la observación, ya que ni Jenner tenía conocimiento de las células inmunes ni hoy los inmunólogos modernos se explican cómo la expresión de un antígeno en la superficie de las células musculares puede dar lugar a una respuesta T y B tan efectiva. Es más, es difícil comprender cómo siendo el ADN una molécula de carga neta negativa puede penetrar en las células sorteando la repulsión de cargas que le plantea la membrana citoplasmática.

El transcurso del tiempo y la acumulación de nuevas experiencias confirmará o no los comentarios de algunos científicos entusiastas que compararon la inmunización con ADN con el descubrimiento de la fusión fría.

Celia E. Coto

Cátedra de Virología, Departamento de Química Biológica,  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires

1. Wolff JA, Malone RW, Williams P<sup>5</sup>, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 1990; 247: 1465-8.
2. Tang DC, Devit M, Johnson SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992; 356, 152-4.
3. Ulmer JB, Donnelly J, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993; 259: 1745-9.
4. Whalen RG. *The DNA Vaccine Web* 1995. <http://www.genneb.com/DNAVax/dnavax.html>
5. Chattergoon M, Boyer J, Weiner DB. Genetic immunization: a new era in vaccines and immune therapeutics. *FASEB J*, 1997; 11: 753-63.
6. Spier RE. International Meeting on the Nucleic Acid Vaccines for the Prevention of Infectious Disease and Regulating Nucleic Acid (DNA) Vaccines. *Vaccine* 1996; 14: 1285-8.
7. Ertl HCJ, Xiang ZQ. Genetic immunization. *Viral Immunology* 1996. 9: 1-9.