

## ***Vacunas de DNA: el presente y el futuro.***

### **Conferencia Magistral**

Eric Dumonteil.

Laboratorio de Parasitología, Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi", Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.

Las vacunas han sido la intervención de salud pública con más impacto para la prevención de un gran número de enfermedades. Estimaciones de la OMS sugieren que las vacunas salvan cerca de 30,000 vidas diariamente, más de 10 millones de vidas cada año, lo que demuestra el éxito que ha tenido esta estrategia (1). Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen cobrando cerca de 45,000 vidas diariamente - 17 millones por año -, y queda muy claro que el hombre, como todos los animales, representa un ambiente ecológico abierto a una infinidad de microorganismos (2). Por estas razones, el desarrollo de nuevas herramientas para minimizar el impacto de las enfermedades infecciosas en la salud humana sigue representando un desafío mayor.

La gran mayoría de las vacunas en uso actualmente están dirigidas contra patógenos que pueden ser controlados eficazmente con anticuerpos. Sin embargo, un gran número de patógenos han desarrollado una multitud de estrategias de escape y mecanismos de resistencia a la actividad lítica de los anticuerpos y han frustrado los esfuerzos de desarrollo de vacunas. La eliminación de estos patógenos requiere de la activación de ciertas

poblaciones específicas de linfocitos T, y las vacunas de DNA representan una de las estrategias novedosas para lograr la activación de tal respuesta inmune celular (3).

El desarrollo extraordinario de las vacunas de DNA les coloca como la alternativa más promisoría para el control de una gran variedad de enfermedades, que no se limitan a las enfermedades infecciosas (4).

Las vacunas de DNA se basan en la inyección directa en el huésped de DNA plasmídico que codifica para un antígeno de un patógeno, en lugar del antígeno proteico o del patógeno atenuado/muerto. La expresión endógena del antígeno dentro de las células del huésped puede inducir una respuesta inmune completa y duradera. Esta respuesta incluye anticuerpos, aunque es frecuentemente más débil que la que se puede obtener con vacunas recombinantes, así como una activación fuerte y duradera de células T cooperadoras y citotóxicas (cuadro I). Este tipo de respuesta inmune es comparable a la respuesta inducida por vacunas atenuadas, pero resulta muy difícil de inducir con vacunas recombinantes (cuadro I), lo que representa una de las grandes ventajas de las vacunas de DNA.

**Cuadro I**  
**Propiedades comparativas de las vacunas de DNA, vacunas atenuadas, y recombinantes. Modificado de (3).**

		Vacuna de DNA	Vacuna atenuada	Protéina recombinante
Respuesta inmune	Humoral cel. B	++	+++	+++
	Célular T <sup>CD4+</sup>	+++	± Th1	± Th1/Th2
	T <sup>CD8+</sup>	++	+++	-
Memoria	Humoral	+++	+++	+++
	Célular	++	+++	±
Producción	Desarrollo y producción	++++	+	++
	Costo	+++	+	+
	Almacen y transporte	+++	+	++
Seguridad		+++	++	++++

Se piensa que la eficacia de las vacunas de DNA se debe principalmente a los mecanismos de presentación de antígenos involucrados (3). Aunque muchos aspectos de este proceso quedan todavía poco claros, estudios recientes han elucidado algunos de estos mecanismos. Estudios iniciales debatieron del papel respectivo de las células presentadoras de antígenos (CPA) y de las células no-linfoideas (musculares o del dermis) para la producción del antígeno y la inducción de la respuesta inmune. Experimentos de resección quirúrgica del sitio de inyección han demostrado la migración de células fuera del sitio de inyección (5, 6). Además, se observó que células dendríticas aisladas del tejido inyectado podían presentar el antígeno in vitro, indicando que capturan el antígeno sintetizado y/o lo expresan endogenamente (7). También, se puede inducir una respuesta inmune aún cuando la expresión del antígeno se restringe a células musculares con un promotor específico de miocitos, lo que confirma la importancia del transfer de antígeno de estas a CPAs (8, 9). Recientemente, el uso de sondas de DNA marcadas con moléculas fluorescentes permitió seguir con precisión la distribución del DNA después de una

inyección intramuscular, confirmando el papel de ambos tipos de células (10). Así, se demostró que el DNA se encuentra inicialmente distribuido en los espacios extracelulares de la mayor parte del músculo, antes de ser captado rápidamente por células musculares próximas al sitio de inyección y células mononucleares localizadas entre la fibras musculares. Tres horas después de la inyección, se empieza a detectar el DNA dentro de los nódulos linfáticos, en vesículas fagocíticas de CPAs.

De esta manera, se piensa que las vacunas de DNA pueden inducir la presentación de antígenos a través de las vías tanto del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I como del CMH clase II, lo que lleva a la activación de células T cooperadoras CD4+ y citotóxicas CD8+ (11).

En adición a sus propiedades inmunogénicas, cabe enfatizar que el desarrollo y la producción de vacunas de DNA son relativamente fáciles y de bajo costo ya que se utiliza un proceso genérico para su producción. También, son muy estables, lo que facilitaría el almacenamiento y distribución de estas vacunas (cuadro I). Estas características explican el gran interés generado por las vacunas de DNA, las cuales se han probado con éxito contra un numero creciente de enfermedades.

Algunos ejemplos incluyen enfermedades como tuberculosis (12, 13), malaria (14), o el SIDA (15, 16), que han frustrado los esfuerzos de investigadores por muchos años, y una gran variedad de otras enfermedades infecciosas como influenza (17, 18), papillomavirus (19), Leishmaniasis (20-22), Trypanosomiasis (23, 24), o Schistosomiasis (25, 26). Además de su uso para la prevención de la infección, se demostró claramente que las vacunas de DNA tienen también un importante potencial para el tratamiento terapéutico de una infección por virus, bacterias o parásitos (27-29), lo que subrayó la versatilidad de esta estrategia y abrió nuevas perspectivas. Así, el uso terapéutico de las vacunas de DNA ha sido extendido a algunos tipos de cáncer, como linfoma, mieloma, cáncer de la próstata o de mama (30-32), y enfermedades

autoinmunes como la diabetes (33, 34).

Estos estudios pre-clínicos han demostrado no sólo la eficacia de las vacunas de DNA en una gran variedad de modelos animales, sino también permitieron establecer la bioseguridad de las vacunas de DNA (cuadro I). Así, se evaluaron los riesgos de integración del DNA al genoma del huésped, y de inducción de auto-inmunidad o tolerancia. Estos estudios indican que el riesgo de integración de DNA plasmídico esta varios ordenes de magnitud inferior a la frecuencia de mutación espontánea del genoma, lo que representa un riesgo no significativo (35, 36). Sin embargo, dado que este riesgo depende en parte de la complementariedad de secuencias entre el plásmido y el genoma, es delicado generalizar estos resultados a otros plásmidos. También, se determinó que es mínimo el riesgo de inducción de una respuesta inmune contra antígenos propios o el DNA en sí mismo, que podría llevar a una reacción de auto-inmunidad, así como la inducción de tolerancia en vez de inmunidad, lo que incrementaría la susceptibilidad del huésped a una infección (37). Estos datos fueron confirmados por los primeros estudios clínicos en humanos de las vacunas de DNA, lo que sugiere que las vacunas de DNA son muy seguras.

Estudios clínicos de fase I de vacunas de DNA, iniciados en 1997 con una vacuna de DNA contra el virus del SIDA, y luego ampliados a Hepatitis B y malaria, confirman que se puede inducir una respuesta inmune en humanos. Esta respuesta incluye anticuerpos y células citotóxicas, y se presenta tanto en voluntarios sanos (vacuna preventiva), como en pacientes infectados (vacuna terapéutica) (43-50). Todos estos estudios también indican que las vacunas de DNA son bien toleradas y seguras. De la misma manera, vacunas de DNA contra el cáncer de la próstata o melanoma en pacientes humanos resultan seguras e inmunogénicas, y el análisis de su eficacia esta en curso (31, 51). Sin embargo, las respuestas inmunes inducidas parecen todavía insuficientes para brindar una protección eficaz contra estos

patógenos o eliminar tumores. Así, la extrapolación de estos resultados alentadores de los modelos murinos a animales más grandes, incluyendo humanos, no resulta sin problemas dado que muchas vacunas muy inmunogénicas y capaces de inducir una buena protección en ratones no son tan eficaces en animales más grandes (38-42).

El estudio de los mecanismos de inducción de la respuesta inmune por las vacunas de DNA ha permitido identificar varias etapas que podrían limitar su eficacia en humanos (52-54). Así, un consenso está apareciendo, que propone que la etapa más limitante sea la administración de la vacuna (10, 55). Dado el papel clave de las CPAs, se piensa que un sistema que favorece su transfección resultaría mucho más efectivo para inducir una respuesta inmune fuerte. De hecho, estudios enfocados en la optimización de la captura de antígenos por CPAs (56-59) o de la transfección de células durante la inmunización, por electroporación (60, 61) o con micropartículas (62, 63) han demostrado que estas estrategias pueden incrementar de manera dramática la respuesta inmune y la eficacia de las vacunas de DNA.

Los resultados obtenidos con las vacunas de DNA en modelos pre-clínicos justifican plenamente los esfuerzos realizados para optimizar su eficacia en humanos, y todavía se tiene que buscar estrategias para permitir el desarrollo de todo el potencial de estas vacunas (55). Así, es muy probable que el desarrollo de los sistemas de administración resulte en una eficacia más grande de las vacunas de DNA, lo que llevaría a cambios dramáticos en el control de varias enfermedades infecciosas y no infecciosas.

#### **AGRADECIMIENTOS.**

Este trabajo ha sido financiado a través del CONACYT (498100-5-J27897M), y por el UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) (T25/181/17 ID980294). El autor agradece a Miguel Rosado por sus comentarios críticos.

**Palabras clave:** Vacunas, vacunas de DNA, vectores transgénicos.

#### REFERENCIAS.

- 1.- Kaufmann SH, Fensterle J, Hess J. The need for a novel generation of vaccines. *Immunobiology* 1999; 201:272.
- 2.- Lévy JP. L'infection est revenue. *Médecine/Science* 2000; 16:863.
3. Seder RA, Hill AVS. Vaccine against intracellular infections requiring cellular immunity. *Nature* 2000; 406:793.
4. Gurunathan S, Wu CY, Freidag BL, Seder RA. DNA vaccines: a key for inducing long-term cellular immunity. *Curr Opin Immunol* 2000; 12:442.
5. Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. *J Immunol* 1997; 158:4529.
6. Klinman DM, Sechler JM, Conover J, Gu M, Rosenberg AS. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol* 1998; 160:2388.
7. Casares S, Inaba K, Brumeau T-D, Steinman RM, Bona CA. Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J Exp Med* 1997; 186:1481.
8. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Fu TM, Donnelly JJ, Caulfield MJ, Liu MA. Expression of a viral protein by muscle cells in vivo induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine* 1997; 15:839.
9. Corr M, von Damm A, Lee DJ, Tighe H. In vivo priming by DNA injection occurs predominantly by antigen transfer. *J Immunol* 1999; 163:4721.
10. Dupuis M, Denis-Mize K, Woo C, Goldbeck C, Selby MJ, Chen M, et al. Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J Immunol* 2000; 165:2850.
11. Tüting T, Austyn J, Storkus WJ, Falo LD. The immunology of DNA vaccines. In *Methods in molecular medicine*, Vol. 29. D. B. Lowrie, and R. R. Whalen, eds. Totowa: Humana Press Inc.; 1999; p. 37.
12. Morris S, Kelley C, Howard A, Li Z, Collins F. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* 2000; 18:2155.
13. Delogu G, Howard A, Collins FM, Morris SL. DNA vaccination against tuberculosis: expression of a ubiquitin-conjugated tuberculosis protein enhances antimycobacterial immunity. *Infect Immun* 2000; 68:3097.
14. Yoshida S, Kashiwamura SI, Hosoya Y, Luo E, Matsuoka H, Ishii A, et al. Direct immunization of malaria DNA vaccine into the liver by gene gun protects against lethal challenge of *Plasmodium berghei* sporozoite. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271:107.
15. Kim JJ, Simbiri KA, Sin JI, Dang K, Oh K, Dentchev T, et al. Cytokine molecular adjuvants modulate immune responses induced by DNA vaccine constructs for HIV-1 and SIV. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19:77.
16. Hanke T, Schneider J, Gilbert SC, Hill AV, McMichael A. DNA multi-CTL epitope vaccines for HIV and *Plasmodium falciparum*: immunogenicity in mice. *Vaccine* 1998; 16:426.
17. Webster RG. Potential advantages of DNA immunization for influenza epidemic and pandemic planning. *Clin Infect Dis* 1999; 28:225.
18. Chen Z, Kadowaki S, Hagiwara Y, Yoshikawa T, Matsuo K, Kurata T, et al. Cross-protection against a lethal influenza virus infection by DNA vaccine to neuraminidase. *Vaccine* 2000; 18:3214.
19. Han R, Cladel NM, Reed CA, Peng X, Budgeon LR, Pickel M, et al. DNA vaccination prevents and/or delays carcinoma development of papillomavirus-induced skin papillomas on rabbits. *J Virol* 2000; 74:9712.
20. Walker PS, Scharton-Kersten T, Rowton ED, Hengge U, Bouloc A, Udey MC, et al. Genetic immunization with glycoprotein 63 cDNA results in a helper T cell type 1 immune response and protection in a murine model of leishmaniasis. *Hum Gene Ther* 1998; 9:1899.
21. Gurunathan S, Prussin C, Sacks DL, Seder RA. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. *Nat Med* 1998; 4:1409.
22. Dumonteil E, Andrade-Narvaez F, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra MJ, Valencia-Pacheco G, Flores-Serrano

*Vacunas de DNA.*

- A, et al. Comparative study of DNA vaccines encoding various antigens against *Leishmania mexicana*. *Dev Biol Stand* 2000; 104:135.
23. Wizek B, Garg N, Tarleton RL. Vaccination with trypanomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 1998; 66:5073.
24. Sepulveda P, Hontebeyrie M, Liegeard P, Mascilli A, Norris KA. DNA-Based immunization with *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein elicits complement lytic antibodies and confers protection against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 2000; 68:4986.
25. Waine G J, Alarcon JB, Qiu C, McManus DP. Genetic immunization of mice with DNA encoding the 23 kDa transmembrane surface protein of *Schistosoma japonicum* (Sj23) induces antigen-specific immunoglobulin G antibodies. *Parasite Immunol* 1999; 21:377.
26. Zhou S, Liu S, Song G, Xu Y, Sun W. Protective immunity induced by the full-length cDNA encoding paramyosin of chinese *Schistosoma japonicum*. *Vaccine* 2000; 18:3196.
27. Boyer JD, Ugen KE, Chattergoon M, Wang B, Shah A, Agadjanyan M, et al. DNA vaccination as anti-human immunodeficiency virus immunotherapy in infected chimpanzees. *J Infect Dis* 1997; 176:1501.
28. Lowrie DB, Tascon RE, Bonato VLD, Lima VMF, Faccioli LH, Stravropoulos E, et al. Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. *Nature* 1999; 400:269.
29. Handman E, Noormohammadi AH, Curtis JM, Baldwin T, Sjolander A. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine* 2000; 18:3011.
30. Bellone M, Cantarella D, Castiglioni P, Crosti MC, Ronchetti A, Moro M, et al. Relevance of the tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J Immunol* 2000; 165:2651.
31. Mincheff M, Tchakarov S, Zoubak S, Loukinov D, Botev C, Altankova I, et al. Naked DNA and adenoviral immunizations for immunotherapy of prostate cancer: a phase I/II clinical trial. *Eur Urol* 2000; 38:208.
32. Stevenson FK, Anderson KC. Preparing the ground for vaccination against multiple myeloma. *Immunol Today* 2000; 21:170.
33. Coon B, An LL, Whitton JL, von Herrath MG. DNA immunization to prevent autoimmune diabetes. *J Clin Invest* 1999; 104:189.
34. von Herrath MG, Whitton JL. DNA vaccination to treat autoimmune diabetes. *Ann Med* 2000; 32:285.
35. Ledwith BJ, Manam S, Troilo PJ, Barnum AB, Pauley CJ, Griffiths TG, et al. Plasmid DNA vaccines: assays for integration into host genomic DNA. *Dev Biol Stand* 2000; 104:33.
36. Haworth R, Pilling AM. The PCR assay in the preclinical safety evaluation of nucleic acid medicines. *Hum Exp Toxicol* 2000; 19:267.
37. Klinman DM, Takeshita F, Kamstrup S, Ishii K, Ichino M, Yamada H. DNA vaccines: capacity to induce autoimmunity and tolerance. *Dev Biol Stand* 2000; 104.
38. Liu MA, McClements W, Ulmer JB, Shiver J, Donnelly J. Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 1997; 15:909.
39. Gramzinski RA, Millan CLB, Obaldia N, Hoffman SL, Davis HL. Immune response to a hepatitis B DNA vaccine in aotus monkeys: A comparison of vaccine formulation, route, and method of administration. *Mol Med* 1998; 4:109.
40. McCluskie MJ, Brazolot Millan CL, Gramzinski RA, Robinson HL, Santoro JC, Fuller JT, et al. Route and method of delivery of DNA vaccine influence immune responses in mice and non-human primates. *Mol Med* 1999; 5:287.
41. Verschoor EJ, Mooij P, Oostermeijer H, van der Kolk M, ten Haaf P, Verstrepen B, et al. Comparison of Immunity Generated by Nucleic Acid-, MF59-, and ISCOM-Formulated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Vaccines in Rhesus Macaques: Evidence for Viral Clearance. *J Virol* 1999; 73:3292.
42. Habel A, Chanel C, Le grand R, Martinon F, Couillin I, Moog C, et al. DNA vaccine protection against challenge with simian/human immunodeficiency virus 89.6 in Rhesus macaques. *Dev Biol Stand* 2000; 104:101.
43. MacGregor RR, Boyer JD, Ugen KE, Lacy KE, Gluckman SJ, Bagarazzi ML, et al. First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. *J Infect Dis* 1998; 178:92.

44. Calarota S, Bratt G, Nordlund S, Hinkula J, Leandersson AC, Sandström E, et al. Cellular cytotoxic response induced by DNA vaccination in HIV-1-infected patients. *Lancet* 1998; 351:1320.
45. Ugen KE, Nyland SB, Boyer JD, Vidal C, Lera L, Rasheid S, et al. DNA vaccination with HIV-1 expressing constructs elicits immune responses in humans. *Vaccine* 1998; 16:1818.
46. Tacket CO, Roy MJ, Widera G, Swain WF, Broome S, Edelman R. Phase I safety and immune response studies of a DNA vaccine encoding hepatitis B surface antigen delivered by a gene delivery device. *Vaccine* 1999; 17:2826.
47. Boyer JD, Chattergoon MA, Ugen KE, Shah A, Bennett M, Cohen A, et al. Enhancement of cellular immune response in HIV-1 seropositive individuals: a DNA-based trial. *Clin Immunol* 1999; 90:100.
48. MacGregor RR, Boyer JD, Ciccarelli RB, Ginsberg RS, Weiner DB. Safety and immune responses to a DNA-based human immunodeficiency virus (HIV) type I env/rev vaccine in HIV-infected recipients: follow-up data. *J Inf Dis* 2000; 181:406.
49. Hanke T, McMichael AJ. Design and construction of an experimental HIV-1 vaccine for a year- 2000 clinical trial in Kenya. *Nat Med* 2000; 6:951.
50. Le TP, Coonan KM, Hedstrom RC, Charoenvit Y, Sedegah M, Epstein JE, et al. Safety, tolerability and humoral immune responses after intramuscular administration of a malaria DNA vaccine to healthy adult volunteers. *Vaccine* 2000; 18:1893.
51. Walsh P, Gonzalez R, Dow S, Elmslie R, Potter T, Glode LM, et al. A phase I study using direct combination DNA injections for the immunotherapy of metastatic melanoma. University of Colorado Cancer Center Clinical Trial. *Hum Gene Ther* 2000; 11:1355.
52. Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 1999; 18:765.
53. Ramsay AJ, Kent SJ, Strugnell RA, Suhrbier A, Thomson SA, Ramshaw IA. Genetic vaccination strategies for enhanced cellular, humoral and mucosal immunity. *Immunol Rev* 1999; 171:27.
54. Rodriguez F, Whitton JL. Enhancing DNA immunization. *Virology* 2000; 268:233.
55. Johnston SA, Qu BX, McGuire M, Stemke-hale K, Sykes K. Application of, and future challenges for, genetic vaccines. *Dev Biol Stand* 2000; 104:3.
56. Fu TM, Guan L, Friedman A, Ulmer JB, Liu MA, Donnelly JJ. Induction of MHC class I-restricted CTL response by DNA immunization with ubiquitin-influenza virus nucleoprotein fusion antigens. *Vaccine* 1998; 16:1711.
57. Biragyn A, Tani K, Grimm MC, Weeks S, Kwak LW. Genetic fusion of chemokines to a self tumor antigen induces protective, T-cell dependent antitumor immunity. *Nat Biotechnol* 1999; 17:253.
58. Lew AM, Brady BJ, Boyle BJ. Site-directed immune responses in DNA vaccines encoding ligand-antigen fusions. *Vaccine* 2000; 18:1681.
59. Deliyannis G, Boyle JS, Brady JL, Brown LE, Lew AM. A fusion DNA vaccine that targets antigen-presenting cells increases protection from viral challenge. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:6676.
60. Selby M, Goldbeck C, Pertile T, Walsh R, Ulmer J. Enhancement of DNA vaccine potency by electroporation in vivo. *J Biotechnol* 2000; 83:147.
61. Widera G, Austin M, Rabussay D, Goldbeck C, Barnett SW, Chen M, et al. Increased DNA vaccine delivery and immunogenicity by electroporation in vivo. *J Immunol* 2000; 164:4635.
62. Baras B, Benoit MA, Dupre L, Poulain-Godefroy O, Schacht AM, Capron A, et al. Single-dose mucosal immunization with biodegradable microparticles containing a *Schistosoma mansoni* antigen. *Infect Immun* 1999; 67:2643.
63. Singh M, Briones M, Ott G, O'Hagan D. Cationic microparticles: A potent delivery system for DNA vaccines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97:811.