

REVISION SOBRE INMUNIZACION CON PLASMIDOS RECOMBINANTES DE EXPRESION TRANSITORIA

A. ESTEPA
G. LORENZO

J. M. COLL
Sanidad Animal, INIA-CISA
Valdeolmos, 28130 Madrid

RESUMEN

Después de los avances en el conocimiento tanto de los virus y de los sistemas inmunológicos de defensa como del desarrollo de la tecnología del DNA recombinante, es notable el desafío que todavía plantea el desarrollo de vacunas víricas menos peligrosas, más eficaces y más fáciles de elaborar. Para generar antígenos víricos para presentación antigénica al sistema inmune sin las limitaciones de las nuevas vacunas no replicativas (péptidos sintéticos, vacunas por subunidades o virus muertos) o de los vectores víricos (vaccinia), se están empezando a utilizar plásmidos recombinantes que codifican antígenos virales de tal forma que se maximice su expresión transitoria en las células hospedadoras. De esta manera, se evitan los problemas de la liberación al medio ambiente de vacunas replicativas y el principal problema de las vacunas no replicativas, es decir, la generación de células presentadoras de antígeno vírico in vivo, lo que generalmente requiere su expresión celular endógena, tal y como ocurre durante una infección vírica natural. El sistema de vacunación con plásmidos DNA puede tener, además, la ventaja de poder utilizar simultáneamente epítomos múltiples procedentes de varios virus, bien en el mismo o en distintos plásmidos de expresión.

PALABRAS CLAVE: Vacunación
Plásmidos
ADN
Expresión transitoria

ALGUNOS DE LOS PROBLEMAS DE LAS VACUNAS ACTUALES

La protección tradicional contra las enfermedades víricas se ha basado en el uso de vacunas replicativas (virus atenuado o vectores víricos) o en el uso de vacunas no replicativas (virus muerto) (Coll, 1988). Aunque las metodologías modernas han contribuido a solucionar algunos problemas relacionados con la vacunación, en general, sus enormes expectativas no se han cumplido (Ada, 1993). Por ejemplo, cualquiera de estas vacunas presenta problemas debido a su eficacia, seguridad y/o costo. Los virus atenuados pueden además, ser inmunosupresivos (Oldstone, 1990), causar la enfermedad si no están atenuados suficientemente (Collins, 1991), o bien, tener limitada su capacidad de inducir inmunidad si están demasiado atenuados (Oldstone, 1990). Una preocupación constante con las vacunas atenuadas es, ade-

Recibido: 13-5-94

Aceptado para su publicación: 10-10-94

Las vacunas por subunidades aunque seguras, son costosas y no muy inmuno-génicas (Coll, 1988; Sedegah *et al.*, 1994). Aunque recientemente hemos asistido al perfeccionamiento de vectores virales como vaccinia y al desarrollo de nuevos sistemas de expresión tales como baculovirus (Ada, 1993), y a pesar de que en el primer caso ya se han logrado con relativo éxito las primeras experiencias de campo (Brochier *et al.*, 1991), todavía persiste el temor a liberar vectores víricos al medio ambiente. Además, su uso repetido en el mismo huésped podría estar limitado por la inmunidad hacia el vector, están sujetos al peligro de reversión o recombinación con otros virus y pueden causar enfermedades e incluso muerte en hospedadores inmunocomprometidos (Cox *et al.*, 1993). En el caso de baculovirus se han conseguido excelentes niveles de expresión de proteínas conformacionalmente adecuadas, sin embargo, el problema de su desarrollo a gran escala sigue siendo el que, hace más de 50 años, tienen planteados y todavía por resolver, los cultivos celulares (Iturralde *et al.*, 1984). Las vacunas no replicativas, los virus muertos, las proteínas víricas recombinantes o los péptidos epitópicos (las llamadas vacunas por subunidades) no son capaces de generar niveles de protección tan grandes como las vacunas replicativas (Coll, 1988), al menos en parte, debido a la cantidad de antígeno y a la pérdida de epítomos durante la inactivación. Se necesitan varias inmunizaciones para conseguir un suficiente nivel de protección.

Debido a que las vacunas no replicativas no producen proteínas víricas sintetizadas endógenamente en las células infectadas, son incapaces de producir células T citotóxicas (CTL) (Sedegah *et al.*, 1994), que es posiblemente un requerimiento necesario para elaborar una respuesta inmunológica eficaz y duradera (Browning *et al.*, 1990). Debido a que los CTLs son capaces de reconocer epítomos conservados derivados de proteínas víricas internas (Coll, 1995; Estepa *et al.*, 1994), varios esfuerzos recientes se han dirigido a diseñar vacunas capaces de inducir CTL lo que solucionaría el problema de la diversidad de la cápsida viral entre distintos aislados y cepas (Ada, 1993). La mayoría de estos esfuerzos se han concentrado en el uso de vectores replicativos para producir el antígeno vírico de interés en la célula infectada o en la introducción de los péptidos epitópicos en su citoplasma (Oldstone, 1990).

En cuanto a las vacunas peptídicas, la selección de péptidos epitópicos depende de la estructura de moléculas de histocompatibilidad (MHC) de cada individuo (Van Bleek, Nathenson, 1990) por lo que este tipo de vacunas pueden tener una limitada efectividad debido a la diversidad de las moléculas de histocompatibilidad en poblaciones genéticamente heterogéneas (Estepa *et al.*, 1994).

Refiriéndose a las vacunas antirrábicas, las más antiguas, un autor moderno resume la situación actual así: «Besides the striking development of a new vaccine technology, all the vaccinal rabies strains are still derived from old isolates made sometimes 50 to 100 years ago, notably by Pasteur himself» (Tordo *et al.*, 1993).

INMUNIZACIÓN CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES DE EXPRESIÓN TRANSITORIA

Una, relativamente, nueva metodología con el potencial de solucionar algunos de los problemas planteados por las vacunas tanto tradicionales como modernas, consiste en la inyección en el hospedador de plásmidos recombinantes de expre-

sión transitoria que incorporan genes que codifican antígenos víricos relevantes para la protección. Descrita en 1990 por primera vez (Lin *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1990), la inyección directa de genes y su expresión transitoria en los tejidos del hospedador se ha demostrado ya con varios genes, en varios tejidos y en especies tan diversas como ratones y peces (Cox *et al.*, 1993; Hansen *et al.*, 1991). Aunque es pronto para hacer una revisión exhaustiva del tema debido a su incipiente experimentación, el potencial de la inyección de plásmidos recombinantes de expresión como posible vacuna contra la gripe (Ulmer *et al.*, 1993) y contra la malaria (Sedegah *et al.*, 1994) se han demostrado recientemente utilizando modelos animales.

La inmunización con plásmidos de expresión transitoria que codifican proteínas víricas puede ser ventajosa, ya que no se manejan virus vivos, no se necesita ensamblaje de las partículas virales y se permite la selección de péptidos epitópicos por cada MHC individual (Betancourt *et al.*, 1993). Además, este método podría utilizarse con plásmidos codificadores de varios minigenes (string-of-beads) o bien con varios plásmidos a la vez (Whinton *et al.*, 1993). Se denominan de expresión transitoria para diferenciarlos de los plásmidos cuyo objetivo es su incorporación al genoma (transfección hereditaria), con la finalidad de obtener seres transgénicos (Betancourt *et al.*, 1993).

REQUERIMIENTOS PARA EXPRESIÓN TRANSITORIA DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES EN CELULAS EUCARIONTES

Aunque algunas proteínas eucarióticas pueden expresarse eficientemente en procariontes (bacterias), la mayoría de las proteínas eucarióticas expresadas en bacterias se pliegan incorrectamente y por lo tanto exhiben bajas actividades específicas comparadas con las proteínas nativas (Estepa *et al.*, 1994). Además, la producción de proteínas eucarióticas completamente activas requiere modificaciones post-transcripcionales tales como, formación correcta de los puentes disulfuro, glicosilación, fosforilación, ensamblaje correcto de monómeros, procesamiento proteolítico o transporte funcional a membranas, procesos todos ellos que no pueden llevar a cabo las células bacterianas (Sambrook *et al.*, 1989). Debido a estos problemas, se ha hecho un esfuerzo considerable para desarrollar sistemas de expresión de proteínas eucarióticas en células eucarióticas. Los vectores plasmídicos empleados para tal fin incorporan elementos de genomas de virus de eucariontes para aumentar la eficiencia de expresión de las proteínas insertadas en ellos (Collins, 1991). Dichos vectores contienen tanto secuencias procarióticas para facilitar la propagación del plásmido en bacterias como secuencias eucarióticas para realizar la transcripción y la traducción en células eucarióticas. Los elementos procarióticos mínimos incluyen un replícón, un gen de resistencia a antibióticos y múltiples sitios únicos de restricción para la incorporación del gen a expresar (Sambrook *et al.*, 1989; Tang *et al.*, 1992).

Generalmente, los DNAs que codifican la proteína vírica (los genes) se obtienen por clonaje de los cDNA a partir de los mRNA, y por lo tanto no contienen los elementos controladores para su transcripción en células eucarióticas, por lo tanto los cDNAs clonados en plásmidos sólo pueden ser correctamente expresados en células eucariontes si estos plásmidos contienen (Fig. 1):

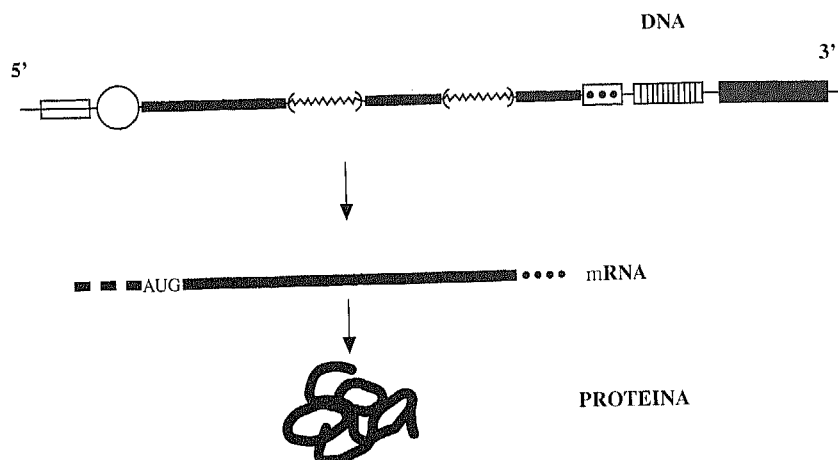


Fig. 1.—Elementos para la transcripción y traducción de un DNA recombinante en una célula eucarionte
Elements for trascription and translation of a recombinant in an eucariont cell

- Promotores específicos del tejido celular en que se va a expresar el gen. Los promotores eucariontes contienen una caja TATA para dirigir la transcripción por la RNA polimerasa, una secuencia 25 bases arriba (hacia el extremo 5') de la caja TATA y las secuencias o elementos amplificadores (enhancers) que aumentan unas 1.000 veces la velocidad de transcripción (hacia el extremo 3') (Betancourt *et al.*, 1993). Un elemento amplificador muy utilizado debido a su funcionamiento en muchos tipos de células distintas, es el de SV40 (Hamsen, 1991 Oldstone, 1990). Otros tipos de amplificadores son los derivados del virus del sarcoma de Rous o del citomegalovirus humano (Isaacson, 1992).
- Señales de poliadenilación del mRNA y de terminación de la transcripción unos cientos de nucleótidos más abajo del gen (hacia el extremo 3'). Las señales que se usan más frecuentemente también se derivan del SV40 (Betancourt *et al.*, 1993; Sambrook *et al.*, 1989).
- Señales para el procesamiento de intrones. Después de la transcripción y poliadenilación, las secuencias no codificadoras (intrones) se eliminan por procesamiento (splicing) para generar el mRNA eucarionte maduro. Dichas señales se localizan en los extremos 5' y 3' del intron (Betancourt *et al.*, 1993). Aunque algunos cDNA pueden expresarse desde plásmidos sin dichas señales de procesamiento, es mejor incluirlas para evitar procesamientos erróneos debidos a secuencias híbridas no deseadas, generadas al introducir el DNA a expresar en el plásmido (Isaacson, 1992).

En algunos vectores se pueden además introducir replicones que aumenten el número de copias en el citoplasma celular eucariótico. Debido a que las células transfectadas con dichos plásmidos mueren cuando el número de moléculas de

plásmido excede 10^4 copias/célula (Cox *et al.*, 1993), estos sistemas se usan para inducir una expresión transitoria pero abundante del gen de interés (Collins, 1991).

Las secuencias clonadas que quieran expresarse en células eucarióticas han de poseer además de las señales para su correcta transcripción, las señales para su traducción, es decir, un sitio de unión del ribosoma y un codon de iniciación situado después de una secuencia consenso: GCC GCC A GCC AUG G (Sambrook *et al.*, 1989). La presencia de otros AUG antes del sitio de iniciación de la traducción la disminuye cientos de veces, por lo que debe evitarse su presencia.

EVIDENCIA EXPERIMENTAL DE INMUNIZACIÓN CON PLÁSMIDOS RECOMBINANTES DE EXPRESIÓN TRANSITORIA

Se ha demostrado que la inyección de plásmidos recombinantes de expresión en el músculo del ratón resulta en la toma del plásmido por las células musculares y en la expresión transitoria de la proteína codificada por el plásmido inyectado. Los plásmidos se mantuvieron en las células musculares episómicamente sin replicación (Lin *et al.*, 1990; Wolff *et al.*, 1990).

La inyección intramuscular en ratón de un plásmido de expresión transitoria codificando una proteína interna conservada del virus de la gripe, resultó en la generación de una inmunidad protectora significativa contra la contraprueba viral. Se produjeron anticuerpos y CTL específicos después de la inyección. La contraprueba vírica de ratones inmunizados con dicho plásmido recombinante resultó en una disminución de los títulos víricos en el pulmón, inhibición de la pérdida de peso y aumento de su supervivencia en relación a los ratones control sin inmunizar (Ulmer *et al.*, 1993).

Tanto los ratones como el ganado vacuno a los que se inyectaron plásmidos de expresión transitoria codificando glicoproteínas del virus herpes bovino desarrollaron respuestas de anticuerpos capaces de neutralizar el virus *in vitro*. La capacidad de respuesta serológica dependía de la cantidad de plásmido inyectado (las máximas respuestas se obtuvieron con 100 µg de plásmido por ratón, (Tabla 1) (Cox *et al.*, 1993).

Plásmidos con varios promotores (SV40, miosina de conejo, promotor Mx humano, etc.) han conseguido transcripción y traducción de genes marcadores (β -galactosidasa o cloranfenicol acetiltransferasa) al inyectarlos en músculo de pez. El análisis histológico del sitio de inyección demostró que los genes marcadores sólo se expresaban en el músculo, alrededor de la trayectoria de la aguja (Hansen *et al.*, 1991). Otro tipo de estudios recientes se ha dirigido a buscar la mejor combinación de promotores intrones y terminadores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos para mejorar la transcripción de plásmidos recombinantes de expresión transitoria en células de peces (Betancourt *et al.*, 1993). Sus resultados indican que la mejor combinación de los elementos de transcripción varía con el gen a expresar, lo que da una idea del esfuerzo que habrá que hacer en cada caso particular para lograr una expresión óptima. Aunque estos resultados son preliminares, su potencial como método futuro de vacunación (utilizando posiblemente las branquias como órgano diana) en Acuicultura es actualmente objeto de investigación en nuestro laboratorio.

TABLA 1
EFFECTO DE LA DOSIS DE PLASMIDO CON DNA RECOMBINANTE
EN LAS REPUESTAS DE ANTICUERPOS ANTI-GLICOPROTEINA G
DEL HERPES BOVINO

Effects of injected plasmid with recombinant DNA dose on the mice antibody responses towards glycoprotein G from mice bovine herpes

Dosis (μ g)	Número de ratones respondedores	Título de anticuerpos anti-G
0	0	—
25	2	250 $\pm$ 212
50	4	375 $\pm$ 310
100	5	1360 $\pm$ 1117

Cinco ratones se inyectaron intramuscularmente con diferentes dosis de plásmido recombinante codificando el promotor del virus del sarcoma de Rous (derivado del pRSVCAT) y la glicoproteína G del herpes bovino. Los títulos de anticuerpos específicos se estimaron por ELISA a las diez semanas y se confirmaron por inmunoblotting (modificado de datos de Cox *et al.*, 1993)

*Five mice were injected intramuscularly with different dosages of the plasmid with the Rous sarcoma promotor (derived from pRSVCAT) and containing the glycoprotein G of bovine herpes. The titers were estimated by ELISA after ten weeks and confirmed by immunoblotting (modified from data from Cox *et al.*, 1993)*

CONCLUSIONES Y FUTURO

La investigación actual en esta nueva aplicación de una tecnología desarrollada principalmente para transfección de células *in vitro* se centra en los medios para aumentar la respuesta inmune investigando métodos alternativos para incrementar la eficiencia de transfección *in vivo*. Ello puede depender de formulaciones especiales, del estudio de los parámetros que afectan a la especificidad de expresión en distintos tejidos y de la cointroducción en los plásmidos de expresión transitoria de genes modificadores de respuesta inmunológica (interleukinas, mitógenos, etc.). Por ejemplo, uno de los métodos desarrollados más recientemente utiliza un sistema de disparo de microproyectiles (plásmidos) en la piel del ratón para inmunizarlo (Tang *et al.*, 1992).

La producción y purificación de las construcciones de plásmidos recombinantes de expresión transitoria es tan eficaz como con los procedimientos tradicionales de purificación de proteínas (Whinton *et al.*, 1993) por lo que su escalado de cara a grandes producciones no parece ofrecer graves problemas. Finalmente, debido a que la expresión proteica se mantiene después de la inyección del plásmido DNA durante varios meses, la persistencia de memorias B y T podría ser capaz de engendrar la inmunidad humoral y celular de larga duración necesarias para una vacunación adecuada.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos CT94-1334 del programa AIR2 de la CEE y el SC94-102 del INIA. G. Lorenzo es un becario predoctoral financiado por el INIA.

SUMMARY

New viral vaccines. Review of immunization with recombinant plasmids of transient expression

After the new developments in our knowledge of both viruses and host defense mechanisms plus the ones in the recombinant DNA technology, is noteworthy the challenge that still exist in the design of vaccines less dangerous, with more efficacy and easier to produce. To generate viral antigens to be presented to the immune system without the limitations of the non-replicative vaccines (synthetic peptides, subunit vaccines or non infectious viruses) or of the viral vectors (vaccinia), recombinant plasmids codifying viral antigens for transient expression are being used. In this way the problems arising from the delivery of vaccine viruses to the environment and the efficacy problems of the non replicative vaccines, mainly due to the no generation of viral antigen presenting cells, are avoided. The DNA plasmid vaccination system might have also the advantage of being used simultaneously with multiple epitopes from different vaccines in either the same or different plasmids.

KEY WORDS: Vaccination
Plasmids
DNA
Transient expresion

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ADA G., 1993. Towards phase III trials for candidate vaccines. *Nature*, 364, 489-490.
- BETANCOURT O. H., ATTAL J., THERON M. C., PUISSANT C., HOUEBINE L. M., 1993. Efficiency of introns from various origins in fish cells. *Molecular Marine Biology Biotechnology*, 2, 181-188.
- BROCHIER B., KIENY M. P., COSTY F., COPPENS P., BAUDUIN B., LECOCQ J. P., LANGUET B., CHAPPUIS G., DEMESTRE P., AFIADEMANYO K., LIBOIS R., PASTORET P. P., 1991. Large-scale eradication of rabies using recombinant vaccinia-rabies vaccine. *Nature*, 354, 520-522.
- BROWNING M. J., HUANG A. S., REISS C. S., 1990. Cytolytic T lymphocytes from the Balb/c-H-2dm2 mouse recognize the vesicular stomatitis virus glycoprotein and are restricted by class II MHC antigens. *Journal Immunology*, 145, 985-994.
- COLL J. M., 1988. Obtención de la inmunidad mediante vacunas constituidas por subcomponentes antígenicos de microorganismos. *Inmunología*, 7, 38-48.
- COLL J. M., 1995. The glycoprotein of rhabdoviruses. *Archives Virology*, (en prensa).
- COLLINS M. K. L., 1991. Practical molecular virology. *Methods in Molecular Biology*. Ed. Humana Press. Clifton, New Jersey, 8, 330.
- COX G. J. M., ZAMB T. J., BABIUK L. A., 1993. Bovine herpesvirus 1: Immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *Journal Virology*, 67, 5.664-5.667.
- ESTEPA A., THIRY M., COLL J. M., 1994. Recombinant protein fragments from haemorrhagic septicaemia rhabdovirus stimulate trout leucocyte anamnestic in vitro responses. *Journal General Virology*, 75, 1.329-1.338.
- HANSEN E., FERNANDES K., GOLDSPIK G., BUTERWORTH P., UMEDA P. K., CHANG K.-C., 1991. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *Febs Letters*, 290, 73-76.
- ISAACSON R. E., 1992. Recombinant DNA vaccines. Ed. MDI. Marcel Dekker. New York, 2, 409.
- LIN H., PARMACEK M. S., MORLE G., BOLLING S., LEIDEN J. M., 1990. Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation*, 82, 2717-2721.
- OLDSTONE M. B. A., 1990. Animal virus pathogenesis. IRL Press. The practical approach series. Eds Rickwood, D. and Hames, B. D., 63, 174.
- SEDEGAH M., HEDSTROM R., HOBART P., HOFFMAN S. L., 1994. Protection against malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proceedings National Academy Sciences*, 91, 9866-9870.
- TANG D.-C., DE VIT M., JOHNSTON S. A., 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature*, 356, 152-154.
- TORDO N., BOURHY H., SATHER S., OLLO R., 1993. Structure and expression in baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. *Virology*, 194, 59-69.
- ULMER J. B., DONNELLY J. J., PARKER S. E., RHODES G. H., FELGNER P. L., DWARKI V. J., GROMKOWSKI S. H., DECK R. R., DE WITT C. M., FRIEDMAN A., HAWE L. A., LEAN-

- DER K. R., MARTINEZ D., PERRY H. C., SHIVER J. W., MONTGOMERY D. L., LIUT M. A., 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259, 1745-1749.
- VAN BLEECK G. M., NATHENSON S. G., 1990. Isolation of an endogenously processed immunodominant viral peptide from the class IH-2Kb molecule. *Nature*, 348, 213-216.
- WHINTON J. L., SHENG N., OLDSTONE M. B. A., MCKEE T. A., 1993. A «String-of-Beads» vaccine, comprising linked minigenes, confers protection from lethal-dose virus challenge. *Journal Virology*, 67, 348-352.
- WOLFF J. A., MALONE R. W., WILLIAMS P., CHONG W., ACSADI G., JANI A., FELGNER P. L., 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science*, 247, 1465-1468.