



ESFUERZOS PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS Y ADYUVANTES

José Vielma ^{1,3}, Neudo Buelvas ², Raibel Suárez ², Luis Gutiérrez³, Roxy Chirinos³,

Isbery Pérez³, Juana Villarreal⁴, Haideé Urdaneta⁵.

1. Laboratorio de Neurobiología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Hospital Universitario de Maracaibo, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
2. Laboratorio de Inmunobiología, Centro de Investigaciones Biomédicas (CIB), Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Hospital Universitario de Maracaibo, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.
3. Laboratorio de Análisis Químico (LAQUNESUR), Universidad Nacional Experimental Sur del Lago “Jesús María Semprum” UNESUR, Santa Bárbara de Zulia, estado Zulia, Venezuela.
4. Escuela Técnica Agropecuaria Robinsoniana “Mesa Cerrada”, Timotes, estado Mérida, Venezuela.
5. Instituto de Inmunología Clínica (IDIC), Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.

CORRESPONDENCIA: José Ramón Vielma Guevara. Laboratorio de Neurobiología, Centro de Investigaciones Biomédicas, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Hospital Universitario de Maracaibo, 9no piso, Maracaibo, estado Zulia. E-mail: jvielma@ivic.gob.ve. Tel: 0261-323179.

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias, virus, hongos, parásitos, el cáncer y las enfermedades autoinmunes, representan las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial. El desarrollo de las vacunas ha representado



un éxito en la mejora de la calidad de vida, al conferir protección contra las enfermedades infecciosas que en el pasado diezmaron a la humanidad. En la actualidad los nuevos retos para desarrollar vacunas efectivas contra la infecciones (principalmente en el caso del virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1 VIH-1), cáncer, enfermedad de Alzheimer, entre otros, ocupan la atención de científicos de todos los países. La idea no es solo prevenir una enfermedad, en algunos casos un paciente recibe una vacuna, una vez enfermo y ésta actúa como una inmunoterapia, mitigando o disminuyendo las consecuencias del proceso. El objetivo principal de ésta revisión es la de destacar los conceptos y características que debe reunir una vacuna o un adyuvante ideal, clasificaciones y las etapas para el desarrollo de las vacunas.

PALABRAS CLAVES: Vacunas, adyuvantes, etapas para el desarrollo de las vacunas.

EFFORTS FOR DEVELOPMENT OF VACCINES AND ADJUVANTS

ABSTRACT

Infectious diseases caused by bacteria, viruses, fungi, parasites, cancer and autoimmune diseases represent the major cause of morbidity and mortality worldwide. The development of vaccines has been a success in improving the quality of life, to confer protection against infectious diseases that in the past, decimated humanity. At present new challenges to develop effective vaccines against infections (mainly in the case of Human Immunodeficiency Virus of type-1, HIV-1), cancer, Alzheimer's disease, among others, occupy the attention of scientists from all countries. The idea is not only prevent a disease, in some cases a patient is vaccinated, once sick, and it acts as an immunotherapy, by mitigating or reducing the consequences of the process. The main objective of this review is to highlight the concepts and characteristics required of a vaccine or adjuvant ideal, classifications and stages for the development of vaccines.

KEYWORDS: Vaccines, adjuvants, stages for the development of vaccines.



INTRODUCCIÓN

Los organismos eucariotas superiores como vertebrados mamíferos poseen un sistema único, complejo y dinámico, especializado en el discernimiento de lo propio y lo extraño, denominado sistema inmune. Desde una concepción teórica podemos dividirlo en sistema inmune innato o inespecífico, constituido por células como: segmentados neutrófilos, basófilos, eosinófilos, proteínas del sistema de complemento, proteínas de fase aguda (proteína C reactiva), entre otros y un sistema inmune específico, caracterizado por memoria inmunológica y constituido por las células presentadoras de antígeno (CPA) (células dendríticas, macrófagos y linfocitos B), linfocitos TCD4⁺, linfocitos TCD8⁺, células plasmáticas.

En la concepción real, estos dos sistemas están estrechamente vinculados e interrelacionados, funcionando como un todo, con el objetivo de defender al organismo de los agentes infecciosos como: virus, bacterias, hongos, protozoarios, helmintos y también de células tumorales. Hay elementos de interconexión de naturaleza proteica y solubles, que ayudan en la señalización intracelular e intercelular, conocidos como citocinas, involucradas en la ontogenia en el timo y la médula ósea de las células del sistema inmune, hasta inclusive en la diferenciación de los mecanismos efectores tanto humorales como celulares, tendientes a la eliminación completa del patógeno (1-5).



El objetivo del presente trabajo es destacar el concepto de vacunas, su clasificación, las etapas necesarias para el desarrollo y la obtención de vacunas; así como el concepto y clasificación de los adyuvantes.

1. Vacunas.

Conceptualmente se considera como vacuna a toda sustancia formada por un microorganismo completo, atenuado o muerto, o bien fracciones del mismo, capaces de inducir una respuesta inmune protectora y duradera frente al patógeno. La finalidad de las vacunas es la de prevenir y controlar futuras infecciones (6). La idea básica de vacunar a un individuo clínicamente sano para protegerlo de una infección ha cambiado con el tiempo, porque ahora puede vacunarse a un enfermo y esta vacuna actúa como inmunoterapia para

paliar las manifestaciones clínicas y mejorar la calidad de vida del paciente.

Características de una vacuna ideal:

- a).- Reproducir (mimetizar) una respuesta inmunológica similar a la de la infección natural.
- b).- La vacuna debe ser efectiva, al ofrecer más del 90% de protección; no obstante cuando la tasa de mortalidad de una enfermedad infecciosa es elevada, un 50-60% de protección frente a ésta, se considera sin lugar a dudas como una buena protección.
- c).- Mínimos efectos secundarios o preferentemente ser completamente segura.
- d).- Inmunidad persistente a largo plazo (años).
- e).- Dosis única y compatible con otras vacunas.
- f).- Administración no invasiva (vía oral preferentemente).



g).- Administración precoz en los primeros meses de vida.

h).- Estable a temperatura ambiente, siendo este uno de los aspectos más importantes por cuanto del costo total derivado de la vacuna, aproximadamente el 70%, corresponde

a la cadena de frío que se sigue para que ésta pueda llegar hasta el usuario.

i).- Fácil producción y económicamente asequible (6-7).

En la tabla I y II observamos las primeras vacunas usadas en humanos.

Tabla 1. Primeras vacunas de uso masivo en seres humanos.

Enfermedad	Agente etiológico	Año	Observaciones
Difteria	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	1939	
Tétanos	<i>Clostridium tetani</i>	1949	
Pertusis	<i>Bordetella pertusis</i>	1953	Vacuna de células completas
Poliomielitis	Virus de la poliomielitis	1954	Administración intramuscular
Influenza	Virus de la influenza	1958	
Poliomielitis	Virus de la poliomielitis	1961	Administración oral
Sarampión	Virus del sarampión	1963	
Parotiditis	Virus de la parotiditis	1966	
Rubéola	Virus de la rubéola	1969	
Meningitis	<i>Neisseria meningitidis</i>	1969	Vacuna con polisacáridos como antígenos
Tuberculosis	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1974	Cepa de <i>Mycobacterium bovis</i> no patógena a los seres humanos, Bacilo de Calmette-Guérin



Tabla 2. Vacunas para uso humano, obtenidas a partir de 1986.

Enfermedad	Agente etiológico	Año	Observaciones
Hepatitis B	Virus de la hepatitis B	1986	Primera vacuna recombinante de uso en humanos
Otitis, meningitis	<i>Haemophilus influenzae</i>	1990	
Fiebre tifoidea	<i>Salmonella typhi</i>	1991	Vacuna viva atenuada. Vacuna constituida por el polisacárido Vi
Hepatitis A	Virus de la hepatitis A	1994	
Varicela	Virus varicela-zoster	1995	
Pertusis	<i>Bordetella pertussis</i>	1996	Vacuna de subunidades (acelular).
Influenza	Virus de Influenza	1997	Empleo de adyuvante
Enfermedad de Lyme	<i>Borrelia burdorferi</i>	1998	
Meningitis	<i>Neisseria meningitidis</i>	2000	Vacuna conjugada
Neumonía, Meningitis	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	2000	Vacuna conjugada

Clasificación de las vacunas

a) Vacunas clásicas

Vacunas vivas atenuadas. Uno de los primeros enfoques para la obtención exitosa de vacunas consistió en la utilización del microorganismo completo (atenuado), capaz de colonizar la superficie de epitelios y de mimetizar la infección, pero sin reproducir el daño tisular. Uno de los procedimientos más comunes para la atenuación de un

microorganismo, es el pase sucesivo en medios de cultivo celulares (virus) o artificiales. Son ejemplos de este tipo de vacunas: la triple viral (rubéola, parotiditis y sarampión), poliomielitis, fiebre tifoidea, viruela y la BCG (Bacilo de Calmette-Guerin). Al tratarse de una mezcla tan compleja de antígenos, no se necesitaba la adición de adyuvantes a la formulación; pero el principal inconveniente es que al tratar humanos



con microorganismos vivos, la posibilidad de la reversión al fenotipo virulento del microorganismo, no queda excluida, este es un riesgo bastante grande y solo un proceso de atenuación con los estándares más altos de calidad posibles evitaban estos problemas; de igual forma, su uso está contraindicado en individuos inmunodeficientes (8). Tradicionalmente, éste era el enfoque utilizado para obtener vacunas vivas atenuadas, pero el advenimiento de mejores herramientas tecnológicas, hizo posible la atenuación genética. Un ejemplo de ello, lo constituye la cepa de *Vibrio cholerae* El Tor 638, en la que la delección de un profago, donde está contenida la información para la expresión de la toxina colérica (principal factor de virulencia bacteriano), ha permitido la obtención de una cepa potencialmente útil como

vacuna. Al tratarse de factores de virulencia importantes como causa de patología, con la delección del gen, parte de éste, e incluso la delección de dos genes distantes en el genoma, la posibilidad de causar patología, aun empleando el microorganismo vivo es dramáticamente reducida. La cepa El Tor 638 posee ventajas en cuanto a la colonización de epitelios, a su inmunogenicidad y a su obtención a gran escala, en comparación a otras dos cepas del *Vibrio cholerae*: la Perú-15 y la CVD 103 HgR del biotipo El Tor, en estudio para la prevención del cólera (9).

Vacunas de microorganismos muertos inactivados. El empleo de microorganismos muertos, trajo consigo la necesidad de incluir adyuvantes a la vacuna, porque el microorganismo no coloniza los epitelios y no mimetiza la



infección natural. Los procedimientos inicialmente utilizados para la inactivación de patógenos incluyeron procedimientos físicos: empleando calor, que desnaturaliza proteínas y métodos químicos que emplearon la formalina y el formaldehído, una vez inactivados y separados de compuestos potencialmente tóxicos para seres humanos (como la formalina o el formaldehído), se utilizan en humanos, confiriendo un buen porcentaje de protección (10-11). Son ejemplos de éste tipo de vacunas: tos ferina, leptospirosis, hepatitis A, Influenza, cólera. La inactivación del microorganismo también tiene el inconveniente de incluir al menos dos dosis de la vacuna (a diferencia de las dosis únicas, con las vacunas de microorganismos vivos atenuados), una respuesta inmune predominantemente

humoral y una cantidad considerable de reacciones adversas, en parte por la toxicidad derivada del procedimiento de atenuación y claramente por el empleo del microorganismo completo. Uno de los aspectos favorables si son comparadas con las vacunas de microorganismos vivos atenuados, es su estabilidad térmica, incluso hay casos en donde no se necesita refrigeración y esto disminuye en gran medida los costos de la vacuna (10).

Vacunas de subunidades. En algunos casos la patogénesis de una enfermedad no es la consecuencia de la infección por parte del microorganismo completo, sino de una pequeña fracción de éste, como por ejemplo una toxina, éste es el caso de la toxina botulínica de *Clostridium botulinum*, agente etiológico del botulismo, o de polisacáridos (Lipopolisacáridos,



constituyentes estructurales de paredes celulares de bacterias Gram negativas, responsables de shock sépticos). En estos casos se siguen varias estrategias: si es el caso de una toxina, se puede inactivar con formaldehído y obtener un toxoide, que no posee la propiedad de causar patología, pero que retiene las características de inmunogenicidad requeridas para que pueda funcionar como vacuna, al conferir protección frente a la enfermedad; o si es el caso de una toxina constituida por varias subunidades, algunas de éstas pueden funcionar como generadoras de daño y otras subunidades pueden contener los epitopos inmunodominantes; entonces solo se trabaja con las subunidades potencialmente inmunogénicas de éstas. Éstas vacunas requieren por lo general de adyuvantes. En el caso del toxoide, la posibilidad de revertirse a toxina, no

queda excluida, por lo tanto su seguridad no es del 100% (12-13).

En el caso de los polisacáridos incluidos como componentes de varias vacunas, se ha podido observar que no existe respuesta de memoria inmunológica, porque éstos polisacáridos son antígenos timo independientes. La posibilidad de generar memoria inmunológica por parte del antígeno esta estrechamente vinculada a la estructura, son excelentes antígenos timo dependientes, los antígenos de naturaleza proteica. El fenómeno de memoria inmunológica (piedra angular en la respuesta inmune que se busca con toda vacuna), está vinculado estrechamente al proceso de presentación antigénica. En el caso de los polisacáridos, la solución es la de acoplarlos a proteínas (proceso conocido como conjugación) y así



poder ser reconocidos por linfocitos TCD4⁺, pudiendo entonces desencadenar respuestas humorales y de memoria inmunológica (12-13). En el proceso de obtención de las fracciones o subunidades, a partir del microorganismo completo, se corre el riesgo de desnaturalización de las proteínas, fenómeno que atenta directamente contra la efectividad de éstas vacunas, es por ello que en la actualidad se recurre a la obtención de éstas subunidades por la tecnología del ADN recombinante (11-13). Las vacunas de subunidades obtenidas por la tecnología del ADN recombinante, también pueden incluirse en esta categoría, pero serán descritas como vacunas de proteínas o péptidos recombinantes, a posterior (clasificadas como vacunas de nueva generación).

b).-Vacunas de segunda generación o nuevas vacunas

Vacunas atenuadas mediante modificación genética.

La utilización del BCG, una cepa de *Mycobacterium bovis*, no patógena para humanos, como profilaxis frente a la tuberculosis pulmonar y diseminada ocasionada por *M. tuberculosis*, es una práctica extendida en todo el mundo (14). El amplio conocimiento de la biología en la interacción *Mycobacterium*-hospedador, ha permitido el establecimiento de una nueva estrategia de prevención de la tuberculosis, mediante la modificación del gen que codifica para una ureasa de la bacteria (mediante delección) (15-16). *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno intracelular estricto, que infecta macrófagos y se multiplica en ellos, uno de los mecanismos de escape



del sistema inmune por parte de la bacteria, consiste en evitar la acidificación del fagolisosoma, y así evitar la crisis respiratoria y poder escapar al citosol para multiplicarse. La modificación genética del BCG consiste en interrumpir la función del gen ureasa y permitir la acidificación del fagolisosoma, activando eficientemente la crisis respiratoria dentro del macrófago y además permitir la presentación del antígeno vía las moléculas del MHC-I y MCH-II, lo cual promueve entre otras cosas, la acción de los linfocitos TCD8⁺, que ejercen un mecanismo efector de citotoxicidad muy potente, mediados por granzimas B y granulozimas, indispensables para la eliminación de *M. tuberculosis* (16). La anterior estrategia de vacunación empleando cepas salvajes de *M. bovis*, limitaba el proceso de presentación del

antígeno sólo al MHC-II, limitando la respuesta de citotoxicidad dependiente de linfocitos TCD8⁺; ahora con la estrategia de modificación genética del BCG, la presentación de antígeno ocurre por las dos vías (MHC-I y MHC-II) potenciando más eficazmente la eliminación del patógeno, por la adición de todos los mecanismos efectores innatos y adquiridos dependientes del proceso de presentación de antígeno del MHC-I (presente en todas las células) a los linfocitos TCD8⁺, que eliminan al *M. tuberculosis* (16).

Vacunas sintéticas. La síntesis química de un antígeno complejo es posible por procedimientos que contemplan el ensamblaje uno a uno de los residuos de aminoácidos para obtener una secuencia de interés, mediante eventos de acoplamiento, protección, desprotección sobre un soporte sólido (17). Los



motivos que se obtienen son lineales y hasta ahora no se ha podido modelar la conformación de los epitopos, hecho que atenta contra la efectividad de este tipo de vacunas, que de igual forma son proclives a la degradación proteolítica (17). Las vacunas sintéticas presentan ventajas en cuanto a la seguridad y a la estabilidad al calor; pero uno de los obstáculos para su masificación es la necesidad absoluta de la caracterización del antígeno, en prácticamente todas las cepas que se hallan podido aislar del agente infeccioso y la protección no necesariamente alcanza el 90% de protección requerida como requisito ideal (8).

Vacunas anti-idiotipo. En fase experimental, se ha tratado un enfoque distinto al tradicional, en las vacunas anti-idiotipo no se inmuniza con el antígeno (inmunización activa), sino

con un anticuerpo, que simule la estructura del antígeno seleccionado, teniendo el inconveniente de requerir la administración de dosis de refuerzo de forma muy frecuente (6). La idea básica de las vacunas anti-idiotípicas es la de utilizar en lugar de un antígeno, un anticuerpo que reproduzca la morfología del antígeno y que por lo tanto induzca inmunidad, pero que sea de por sí inocua. Para producir una vacuna de este tipo, el primer paso es obtener un anticuerpo contra el antígeno. Éste anticuerpo denominado anticuerpo idiotípico, se inyecta en un animal que responde produciendo anticuerpos contra él, los anticuerpos anti-idiotípicos. Este último anticuerpo puede actuar como vacuna puesto que contiene un determinante antigénico similar al del antígeno original (6).



Vacunas de proteínas o péptidos recombinantes: La selección y obtención de antígenos recombinantes como vacunas fue exitosa a partir de 1986, cuando se obtuvo la primera vacuna recombinante de uso masivo contra la hepatitis B; empleando adyuvantes más el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, se observó una buena protección frente a la enfermedad y la disminución de su consecuencia más peligrosa, el carcinoma hepatocelular primario. Ésta es una vacuna de inclusión obligatoria en los programas de vacunación en la mayoría de los países a nivel mundial y su uso está igualmente indicado a los profesionales del área de la salud (médicos, enfermeras, asistentes, auxiliares, licenciados en bioanálisis). Una de las características más importantes a tener en cuenta para el

desarrollo de este tipo de vacunas, son los sistemas de expresión utilizados, sobre todo en lo concerniente al rendimiento del proceso de purificación del antígeno, para poder escalar esta producción a nivel industrial, en el caso de hepatitis B, se empleo el sistema de la levadura *Sacharomyces cereviceae*; no obstante es importante destacar que este es un sistema que permite las modificaciones pos-traduccionales de proteínas, un aspecto a tomar en cuenta en lo relacionado a la inmunogenicidad de la vacuna (18).

Vacunas por inserción o clonaje de genes de interés en vectores vivos. Se han utilizado en investigación para el desarrollo de vacunas, vectores vivos como virus (vaccinia, adenovirus) y cepas bacterianas (*Salmonella* spp.), la idea es aprovechar las características del organismo como vector para transportar



genes de interés y obtener posiblemente vacunas multivalentes, es decir, contra varias enfermedades. La inactivación de genes que tienen que ver con factores de virulencia del vector es absolutamente indispensable; hay problemas con los niveles de expresión de los genes foráneos, ya que pueden perderse los plásmidos con las construcciones de interés. Por tanto, se necesita obtener un sistema de expresión estable, un ejemplo de esto se consiguió incorporando los genes de interés desde el plásmido hasta el genoma del vector. Las ventajas obvias están en el hecho de que el vector (hospedador) puede colonizar epitelios con facilidad y generar respuestas a nivel de mucosas, de tipo humoral y celular. Éstas vacunas requieren el refuerzo con el antígeno (no sirven estrategias en una sola dosis), son por lo general estrategias

metodológicas con costos muy elevados; pueden existir anticuerpos preformados contra el vector que impidan la colonización eficiente de epitelios y la posibilidad de reversión al fenotipo virulento del vector no queda exento (6).

Vacunas de ADN. Al emplearse vacunas de ADN se promueve la expresión dentro de la célula de los epitopos de la vacuna. Son bastante seguras, en términos de no revertir a la patología causada por el microorganismo completo, pero pudiesen presentarse problemas de autoinmunidad o incluso de no generar respuesta frente al ADN y generarse una tolerancia a la vacuna, el proceso de transfección *in vivo* requerido para este tipo de vacunas, puede tener una baja eficiencia. En general las vacunas de ADN generan respuesta inmune



humoral y celular, siendo ésta última muchas veces pobre frente al antígeno. La respuesta inmune generada por este tipo de vacunas a nivel de mucosas es generalmente pobre y se deben recibir dosis de refuerzo (11, 19-21). Dentro de las ventajas de las vacunas de ADN destacan las siguientes: pueden utilizarse en neonatos, son de fácil producción, se pueden administrar múltiples antígenos (11, 19-21). Timmerman *et al.*, 2002 (22) realizaron estudios de fase clínica I y II, en relación a la inmunogenicidad y toxicidad de una vacuna de ADN plasmídico, con construcciones quiméricas de proteínas (inmunoglobulinas) del linfoma de células B. La vía de administración de ésta vacuna de ADN fue la intramuscular y las dosis fueron 200, 400 y 600µg de ADN, una mensual,

durante tres meses, la estrategia de re-exposición al antígeno consistió en una dosis de 1800µg del antígeno, sin el vector por vía intradérmica o intramuscular. Mediante ésta estrategia se notó una respuesta inmune antitumoral muy modesta en los 12 pacientes seleccionados para la realización de este estudio. Los autores sugieren estudios adicionales en lo referente a la dosis óptima de antígeno, rutas de administración, diseño de vectores y de las estrategias de re-exposición. Ningún efecto tóxico adverso fue evidenciado con el uso de esta vacuna en seres humanos (22).

c) Nuevas tecnologías

Identificación del anti-genoma. Utilización de Genotecas, con propósito de vacunas. Sistemas de fago display, bacterial display. George P. Smith es el padre del sistema que se



conoce como fago display. Algunos fagos son buenos vectores de clonación y de expresión de genes, ya que pueden expresar secuencias extrañas de ADN como parte de sus proteínas de cubierta. Cuando estas proteínas híbridas se empacan como partículas del fago, la proteína extraña (antígeno) es expresada en la superficie externa (8, 23). Una genoteca de fagos es una mezcla heterogénea de clones de fagos, cada uno expresando un inserto de ADN diferente. Esto puede posibilitar la evaluación con anticuerpos, receptores, enzimas u otros marcadores que permitan identificar el péptido mostrado en su superficie. El fago seleccionado se replica en bacterias. De ésta manera se puede realizar un paneo general de prácticamente todo el genoma de un microorganismo de interés, para buscar posibles candidatos a vacunas o incluso

se han desarrollado estrategias, en donde el uso de la genoteca de expresión de un microorganismo (completa o fraccionada), se ha empleado para evaluar un posible efecto protector frente al reto con el patógeno, y de allí derivar un posible candidato a vacuna, estrategia en fase experimental, solo en el modelo animal (8, 23). Hernández *et al.*, 2006 (24) lograron evaluar el carácter protector de una genoteca de expresión de *M. tuberculosis*, en el modelo murino de la tuberculosis pulmonar, empleando un sistema bacterial display. En los animales inmunizados se evidenció una reducción significativa en el número de unidades formadoras de colonias recuperadas del pulmón, luego del reto intratraqueal con BCG, así como también un menor número de lesiones tisulares e infiltrado perivascular en



pulmón de los animales vacunados en comparación a los controles no vacunados.

Vacunología inversa. Las técnicas convencionales han fallado en proporcionar con éxito vacunas eficaces contra la mayoría de las enfermedades ocasionadas por microorganismos (un buen ejemplo lo constituyen los fracasos en el intento de obtener una vacuna universal protectora frente al VIH-1). Los avances biotecnológicos han permitido la secuenciación del genoma, revolucionando el enfoque en el desarrollo de vacunas, en donde la genómica, proteómica, interactómica, metabolómica, entran a jugar un papel preponderante. La vacunología inversa o reversa, comienza por el análisis de las secuencias del genoma, mediante el uso de herramientas de bioinformática, que permiten identificar los antígenos

más probables a ser candidatos a vacunas. Los candidatos son seleccionados en función de su predicción como proteínas de superficie o secretadas, para luego ser clonados, expresados y analizados para confirmar su localización celular *in vitro* y, empleando modelos animales, evaluar su inmunogenicidad y capacidad protectora. Esta metodología fue empleada con éxito por primera vez con *Neisseria meningitidis* serogrupo B (25).

Etapas para el desarrollo de Vacunas

El desarrollo de toda vacuna de administración masiva en seres humanos y que se incluya dentro de los programas de vacunación aprobados por las autoridades sanitarias en cualquier país del mundo incluyen 3 fases: Investigación básica, desarrollo



preclínico y farmacéutico y ensayos clínicos (5-6).

a) Investigación básica. La primera fase en el desarrollo de una vacuna incluye la búsqueda de antígenos, adyuvantes, elección de modelos animales idóneos para el estudio de la enfermedad. La investigación básica se extiende desde el diseño y concepción teórica del producto hasta la prueba de concepto. Esta fase abarca entre 1 a 4 años en promedio, e incluye:

-Propuesta del producto (antígenos, adyuvantes, vía de administración, cobertura poblacional esperada, tecnología de producción).

-Estudio de mercado e **interferencia con otras patentes.**

-Obtención de antígenos a gran escala.

-Elección del modelo o de los modelos animales adecuados, como por ejemplo

el uso de ratones BALB/c, C57BL/6 en leishmaniosis.

-Elaboración de la formulación provisional (adyuvantes y preservantes aprobados o no para uso humano).

-Evaluaciones de la inmunogenicidad y obtención de información toxicológica preliminar.

-Estudios de los mecanismos de acción y caracterización de la respuesta inmune (determinación y cuantificación de citocinas, inmunoglobulinas, ensayos de proliferación linfocitaria, relación de linfocitos TCD4⁺/TCD8⁺).

-Técnicas para el control de calidad sanitario de la vacuna (5-6).

Prueba de concepto: demostración de la eficacia e inocuidad de una formulación experimental, provisional, del candidato a vacuna. Uno de los aspectos a destacar en la realización de la investigación básica, es lo



relacionado a los correlatos de protección, es decir, una vez aplicada la estrategia de inmunización (vacunación) a los animales seleccionados, se les reta con el microorganismo contra el cual se desarrolló la vacuna y se realiza la evaluación de la protección o no de ésta (ensayo de reto). Esta constituye: “la variable que, provisionalmente, se toma como criterio de **eficacia** durante la fase de investigación-desarrollo de la vacuna y en las primeras (I-II) fases de los ensayos clínicos” (5-6).

b) Desarrollo preclínico y farmacéutico. El desarrollo preclínico de una vacuna incluye ensayos toxicológicos y farmacológicos en modelos animales, previa evaluación en seres humanos (fase de desarrollo clínico), dichos estudios están en función de la población a la cual se va a aplicar la vacuna, pueden incluir por

ejemplo ensayos de toxicidad al feto. En el desarrollo farmacéutico se contempla la obtención de una formulación estable, potencialmente útil en seres humanos y que cumpla las normas internacionales de buena práctica médica. Esta fase también incluye el escalamiento industrial: procesos de fermentación, inactivación del microorganismo, purificación de antígenos por tecnología de ADN recombinante, liofilización de los antígenos. La estabilidad de la formulación a diferentes temperaturas (ambiente, cadena de frío) y las pautas y normas de control de calidad, esperando alcanzar los estándares más altos del control de calidad (5-6).

c) Ensayos clínicos

Fase I. Referida a la primera introducción de una vacuna en ensayo en una población humana para determinar inicialmente su seguridad y



sus efectos biológicos, incluida su inmunogenicidad. Esta fase puede incluir estudios de dosis y vías de administración y, generalmente, involucra a menos de 100 voluntarios (26).

Fase II. Referida a los ensayos iniciales para determinar la efectividad de la vacuna en un número limitado de voluntarios (generalmente entre 200 y 500); esta fase se centra en la inmunogenicidad (26).

Fase III. Esta etapa tiene como objetivo evaluar de forma más completa la seguridad y la efectividad en la prevención de enfermedades, involucrando un número mayor de voluntarios en un estudio multicéntrico adecuadamente controlado (26).

Fase IV. Es realizada después de la comercialización de la vacuna, para estudiar condiciones de uso distintas a

las autorizadas, como nuevas indicaciones, y la efectividad y seguridad en la utilización clínica diaria (26).

Vacunas en existencia y en desarrollo.

Las vacunas introducidas en los programas de inmunización antes de la década de los 80 se presentan en la tabla 1. Luego de la década de los años 80 se han obtenido licencia para vacunas de uso humano para las enfermedades descritas en la tabla 2.

2. Adyuvantes

Concepto. La palabra adyuvante proviene del latín “adyuvare” que significa ayudar, conceptualmente un adyuvante es toda sustancia o preparado capaz de aumentar, potenciar o mejorar la inmunogenicidad y por tanto la efectividad de los antígenos presentes en una vacuna (11, 27).

Características de un adyuvante ideal



- a).- Debe tener una estructura y composición química definida, que permita una producción consistente. Este aspecto no necesariamente se cumple, por ejemplo en el caso del cocleato, un adyuvante derivado de vesículas de membranas y paredes celulares de bacterias Gram negativas, presentó el inconveniente de no poder ser manufacturado en un principio, porque el procedimiento para obtenerlo no era reproducible y esto limitaba su utilización.
- b).- Estable e inerte en relación con el antígeno que se aplica.
- c).- Biodegradable.
- d).- Ejercer su función a bajas dosis y con necesidad de pocas inmunizaciones.
- e).- Resultar efectivo en niños pequeños y lactantes.
- f).- No ser inmunogénico por sí mismo.

g).- Permitir manipular la respuesta inmune celular y humoral según se requiera. En el caso de las sales de aluminio utilizadas como adyuvantes de vacunas en humanos (único aprobado por la Federación de Drogas Americana, FDA), la respuesta inmunológica es de tipo Th2, lo cual implica una producción predominante de anticuerpos y una menor respuesta inmune celular (28).

Ningún adyuvante de los disponibles actualmente reúne todos estos requisitos, el mejor es el adyuvante de Freund (11, 27, 29).

Mecanismos de acción de los adyuvantes

A).- Afectan el cambio de isotipo de las inmunoglobulinas y favorecen la producción de ciertos isotipos (30).

B).- Estimulan la producción de citocinas. Por técnicas de hibridización



in situ ARN-ARN, se pudo evidenciar en células de bazo, obtenidas a partir de ratones BALB/c y C57BL/6, la inducción y producción de ARNm de las interleucinas 4, 5 y 13 (IL-4, IL-5 e IL-13, compatibles con el perfil Th2), en el caso del uso como adyuvantes: del hidróxido de aluminio $Al(OH)_3$, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, y Quil A. En este mismo diseño experimental, el compuesto designado como poli(I), indujo la producción del ARNm del interferon gamma ($INF-\gamma$), interleucinas 2 y 6 (IL-2, IL-6), citocinas compatibles con un perfil Th1. El Lipopolisacárido y el cloruro de litio indujeron una respuesta principalmente de interleucina 6 (IL-6) y del factor de necrosis tumoral alfa ($TNF-\alpha$). Adyuvantes capaces de estimular la producción de citocinas de un perfil

mixto Th1 y Th2, compatibles con la detección del ARNm correspondientes a las interleucinas 5 y 6 (IL-5 e IL-6) también fue observado (30).

Clasificación de los Adyuvantes

a) Naturales: incluyen inmonomoduladores endógenos de la respuesta inmune como citocinas, quimiocinas y ligandos de receptores similares a toll (TLR). En Leishmaniosis se ha empleado Interleucina 12 (IL-12), como adyuvante para el desarrollo de vacunas, pero los resultados han sido contradictorios (27, 29, 31).

b) Adyuvantes convencionales: En el modelo del ratón BALB/c, emulsificando ovalbúmina (antígeno) con el adyuvante completo e incompleto de Freund, se demostró un predominio de citocinas Th1 y una producción balanceada de $INF-\gamma$ e IL-4, mediante



la técnica de ELISA, con el uso del adyuvante completo de Freund, al compararlo con el adyuvante incompleto de Freund, a los 28 días pos-inmunización por vía subcutánea. Los ensayos de proliferación linfocitaria, de células extraídas del ganglio linfático de estos ratones mostraron una respuesta antígeno-específica similar a los 7 días pos-inmunización. Todos los resultados fueron confirmados por citometría de flujo (citocinas intracelulares). La expresión de moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 es sobre-regulada por ambos adyuvantes en células dendríticas derivadas de ganglio linfático, hecho que pone de manifiesto un aumento en la presentación antigénica (efecto dependiente del adyuvante). No hubo cambios significativos en la expresión de CD40, CD54 en este modelo y los niveles de expresión de la IL-12 por

parte de las células dendríticas fueron comparables con ambos adyuvantes. De lo anteriormente expuesto, estos autores sugieren que el mecanismo de inmunidad celular a larga data, puede ser inducido por el uso del adyuvante de Freund, con ventajas adicionales para el caso del adyuvante completo de Freund (32).

c) Nuevos Adyuvantes:

Proteoliposomas: Venier *et al.*, en 2007 (33), obtienen proteoliposomas de tamaño muy pequeño, designados como VSSP por sus siglas en inglés, este nuevo adyuvante deriva de proteínas de membrana de *Neisseria* sp., más el monosialogangliósido (GM3), formando nanopartículas, que son potencialmente útiles con fines de vacuna terapéutica en pacientes con tumores positivos a la presencia de GM3. Los mecanismos de acción de las



VSSP como adyuvante contemplan la maduración de células dendríticas humanas y de ratón *in vitro*. En el modelo de cáncer estudiado, VSSP mostró elucidar una respuesta anti-tumoral y anti-GM3, en combinación a antígenos de naturaleza peptídica en ratones. Con respecto a la producción de citocinas, VSSP indujo la producción en células mononucleares de sangre periférica de humanos, de la interleucina 6 (IL-6). Los niveles de secreción de interleucina 10 (IL-10) fueron muy bajos, de igual forma los niveles del péptido p40 interleucina-12 (p40-IL-12) pudo ser cuantificado por citometría de flujo, no así el péptido p70 interleucina 12 (p70-IL-12). En el 56% de las muestras estudiadas se detectó la presencia de una citocina muy importante del perfil de células T

ayudadoras 1 (Th1) como lo es el interferon gamma INF- γ (33).

Por todo lo anteriormente expuesto VSSP es un candidato como adyuvante a ser probado en humanos, cuando la respuesta inmune deseada es de células Th1, útil en infecciones por patógenos intracelulares o en cáncer. Además los autores argumentan que el mecanismo de acción de éste adyuvante no estuvo relacionado al contenido de lipopolisacáridos (como en el caso de otros adyuvantes derivados de paredes celulares de bacterias Gram negativas), pero si a la transducción de señales vía receptores TLR2 (33).

3. Perspectivas y consideraciones finales

1) En Venezuela no se produce ninguna vacuna de uso masivo en humanos, todos los productos se importan de otros países: Estados Unidos, Europa y Cuba;



es imprescindible realizar estudios de investigación básica para la búsqueda de candidatos a vacunas en enfermedades que afectan a nuestra población como: neurocisticercosis, enfermedad de Chagas y leishmaniosis, entre otras.

2) En la selección de candidatos a vacunas deben utilizarse las herramientas de bioinformática, proteómica y genómica.

3) Debe profundizarse el estudio y la búsqueda de adyuvantes útiles en seres humanos.

REFERENCIAS

1. Siham S, Mendoza J, Rossi N, Rosales O, Muñoz J, Hernández M. Transplante renal. Aspectos inmunológicos. Consejo de Estudios de Postgrado (CEP), Consejo de Publicaciones de la Universidad de los

Andes, Mérida, Venezuela, 1997, 125 p.p.

2. Paul WE. Fundamental immunology. Editor, William E. Paul. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, United States, 2013.

3. Medzhitov R, Janeway C. Innate immunity. N Engl J Med 2000, 343 (5):338-344.

4. Castillo-Solórzano C, Andrus J, Roses-Periago M. El desarrollo de nuevas vacunas: generación de información para la toma de decisiones. Rev Panam Salud Publica 2004, 15 (1): 1-3.

5. Álvarez-García F. Características generales de las vacunas. Características generales de las vacunas. Bases inmunológicas. Inmunidad colectiva y de grupo. Composición, clasificación, conservación/manipulación, seguridad, contraindicaciones, vías de administración, intervalos de



separación. *Pediatr Integral* 2015, XIX (10): 666-674.

6. López M, Mallorquín P, Pardo R, Vega M. (2004). Vacunas de nueva generación. Informe de vigilancia tecnológica. Genoma, España. Salud humana, 2004, 1-114 pp. Disponible en: http://www2.uned.es/091279/ingenieria_genetica/PDFs/vacunas.pdf

7. Ortiz JR, Perut M, Dumolard L, Wijesinghe PR, Jorgensen P, Ropero AM, Danovaro-Holliday MC, Heffelfinger JD, Tevi-Benissan C, Teb NA, Lambach P, Hombach J. A global review of national influenza immunization policies: Analysis of the 2014 WHO/UNICEF Joint Reporting Form on immunization. *Vaccine*. 2016, doi: 10.1016/j.vaccine.2016.07.045.

8. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas I: vacunas vivas atenuadas. *Vacunas* 2002, (3): 29-33.

9. García L, Díaz M, García H, Rodríguez B, Fernández R, Año G, Cedré B, Valmaseda T, Suzarte E,

Ramírez M, Pino Y, Campos J, Menéndez J, Valera R, González D, González I, Pérez O, Serrano T, Lastre M, Miralles F, Campo J, Maestre J, Pérez J, Talavera J, Pérez A, Marrero K, Ledón T, Fando R. The Vaccine Candidate *Vibrio cholerae* 638 Is Protective against Cholera in Healthy Volunteers. *Infect Immun* 2005, 73 (5): 3018-3024.

10. Ada G. Vaccines and Vaccination. *N Engl J Med* 2001, 345 (14): 1042-1053.

11. Rosenthal K, Zimmerman D. Vaccines: All things considered. *Clinic vacci Immunol* 2006, 13 (8): 821-829.

12. Eskola J. Polysaccharide-based pneumococcal vaccines in the prevention of acute otitis media. *Vaccine* 2000, 19 (1): 78-82.

13. Tan M, Jiang X. Recent Advancements in Combination Subunit Vaccine Development. *Hum Vaccin Immunother*. 2016. doi: 10.1080/21645515.2016.1229719.



14. Carrizo-Chuecos JT. Nuevas vacunas de BCG. Arch Venez Puer Ped 2011, 74 (3): 127-134.
15. Ada G, Ramsay A. Vaccines, vaccination and the immune response. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. 1-247 pp.
16. Kaplan G. Rational Vaccine Development-A New Trend in Tuberculosis control. New Engl J Med 2005, 1624-1625.
17. Merrifield B. Concept and Early Development of solid-phase Peptide Synthesis. Meth enzymol 1997, 289: 3-13.
18. Chang M, Chen C, Lai M. Universal hepatitis B vaccination in Taiwan and the incidence of hepatocellular carcinoma in children. N Engl J Med 1997, 336: 1855-1859.
19. Modlin R. A toll for DNA vaccines. Nature 2000, 408: 659-660.
20. Cheng W. The Density Code for the Development of a Vaccine? J Pharm Sci. 2016. doi: 10.1016/j.xphs.2016.07.020.
21. Oliveira ER, Gonçalves AJ, Costa SM, Azevedo AS, Mantuano-Barradas M, Nogueira AC, Alves AM. Aspects of T Cell-Mediated Immunity Induced in Mice by a DNA Vaccine Based on the Dengue-NS1 Antigen after Challenge by the Intracerebral Route. PLoS One 2016, 11 (9):e0163240. doi: 10.1371/journal.pone.0163240. eCollection 2016.
22. Timmerman J, Singh G, Hermanson G, Hobart P, Czerwinsky D, Taidi B, Rajapaksa R, Caspar C, van Beckhoven A, Levy R. Immunogenicity of a plasmid DNA encoding chimeric idiotype in patients with B-Cell Lymphoma. Cancer Research 2002, 62: 5845-5852.
23. Tapia D, Ross BN, Kalita A, Kalita M, Hatcher CL, Muruato LA, Torres AG. From In silico Protein Epitope Density Prediction to Testing



Escherichia coli O157:H7 Vaccine Candidates in a Murine Model of Colonization. *Front Cell Infect Microbiol* 2016, 6: 94. doi: 10.3389/fcimb.2016.00094. eCollection 2016.

24. Hernández Y, Corona D, Sifontes S, Infante J, Sarmiento M, Olivares N, Casado E, Díaz D, Díaz R, Domínguez, A. Immunization of mice with a *Mycobacterium tuberculosis* genomic expression library results in lower bacterial load in lungs after challenge with BCG. *Tuberculosis (Edinb)* 2006, 86 (3-4): 247-254.

25. Ferreira J, Porco A. Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología inversa. *Interciencia* 2008, 33 (5): 353-358.

26. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS). Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos. ISBN 92 9036 056 9, Ginebra, 1993, pp.57-58.

27. Brewer J. (How) do aluminium adjuvants work? *Immunol Lett* 2006, 102: 10-15.

28. Li L, Petrovsky N. Molecular Adjuvants for DNA Vaccines. *Curr Issues Mol Biol*. 2016, 22:17-40.

29. Cox J, Coulter A. Adjuvants, a classification and review of their modes of action. *Vaccine* 1997, 15: 248-256.

30. Victoratos P, Yiangou M, Adramidis N, Hadjipetrou L. Regulation of cytokine gene expression by adjuvants *in vivo*. *Clin Exp Immunol* 1997, 109: 569-578.

31. Rock K, Hearn A, Chen C, Shi Y. Natural endogenous adjuvants. *Springer Semin. Immunopathol* 2005, 26: 231-246.

32. Shibaki A, Katz S. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp Dermatol* 1992, 11 (2): 126-134.



33. Venier C, Guthmann M, Fernández L, Fainboim L. Innate-immunity cytokines induced by very small size proteoliposomes, a *Neisseria*-derived

immunological adjuvant. Clin Exp Immunol 2007, 147 (2): 379-388.