

Vacunología clásica y nuevas tecnologías en el diseño de vacunas

María Teresa Criado, Sandra Sánchez y Carlos M. Ferreirós

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela. España.

La prevención de muchas enfermedades infecciosas y otras patologías, como las alergias, las enfermedades autoinmunes y el cáncer, suponen todavía un gran reto en el siglo XXI. Se han conseguido ya grandes logros, como la erradicación de algunas enfermedades y el control de otras muchas, y los avances en nuevas tecnologías en las áreas de la biología molecular, el ADN recombinante, la bioquímica de proteínas, la bacteriología y la inmunología nos permiten predecir que en los próximos años se seguirá progresando. Los aspectos técnicos serán refinados de tal forma que cualquier antígeno o epítipo podrá ser presentado de manera altamente inmunogénica. Estas tecnologías modernas han llevado a la formulación de un paradigma en la investigación de vacunas en el que la genómica y/o proteómica de las enfermedades se analizan *a priori* con el fin de identificar los factores que estarían implicados en la respuesta inmune, y que podrían ser adecuados como candidatos vacunales.

Palabras clave: Vacunas. Inmunización. Biología molecular.

Classic vaccinology and advances in vaccine design

The prevention of many infectious diseases, allergies, autoimmune diseases, and cancer continues to be a challenge in the twenty-first century. Nonetheless, considerable advances have already been made, such as the eradication of certain infectious diseases and effective control of many others, and new technology is being developed in areas related to molecular biology, recombinant DNA, protein biochemistry, microbiology, and immunology. The current trends point to continued progress in coming years. Technical skills will become highly refined, so that any antigen or epitope can be presented in a highly immunogenic form within a vaccine. Modern technology has led to the formulation of a new paradigm in vaccine development, in which the genomic

and/or proteomic aspects of diseases are analyzed *a priori* to identify factors implicated in the immune response that may serve as promising vaccine candidates.

Key words: Vaccines. Immunization. Molecular biology.

Introducción

La vacunación como un intento deliberado de proteger al hombre contra las enfermedades tiene una larga historia aunque sólo desde el siglo XX se ha convertido en una práctica habitual. Los primeros intentos de vacunar son casi tan antiguos como los de erradicar las enfermedades. Se cree que los chinos trataron la viruela por vacunación en el siglo VI, aunque los primeros registros escritos son de alrededor del año 1000. Sin embargo, como es sabido, el primer intento científico de controlar una enfermedad infecciosa por inoculación sistemática deliberada es el trabajo de Jenner con la vacuna de la viruela bovina. El siguiente avance en vacunación fue conseguido por Pasteur con sus estudios de vacunación con el virus del cólera aviar, sentando bases importantes como la atenuación, la modificación por pases repetidos y la necesidad de reemplazar la vacunación "persona a persona" con algo más seguro, más consistente y menos peligroso (especialmente en la transmisión de otras enfermedades durante el proceso de vacunación). En los últimos 200 años, la vacunación ha conseguido controlar varias enfermedades importantes, al menos en ciertas partes del mundo: viruela, difteria, tétanos, poliomielitis y sarampión, entre otras. En el caso de la viruela, el sueño de la erradicación se ha cumplido, ya que la enfermedad ha desaparecido. La vacunación contra la gripe, hepatitis B, neumococo y *Haemophilus influenzae* tipo B han supuesto un gran avance contra estas infecciones, pero todavía queda mucho por hacer, incluso en países desarrollados, ya que el fenómeno de emerger y reemerger de enfermedades infecciosas es uno de los retos actuales en esta área¹.

El impacto de las vacunaciones en la salud es difícil de exagerar, ya que, con la excepción de la potabilización del agua, ninguna otra actuación, ni siquiera el uso de los antibióticos, ha tenido tan gran efecto en la reducción de la mortalidad y el crecimiento de la población^{2,3}. Se trata de la intervención más efectiva desde la perspectiva de la salud pública, aunque actualmente esté infrautilizada, especialmente en los países en desarrollo, ya que es trágico que mueran aproximadamente dos millones de niños al año en todo el mundo como consecuencia de las enfermedades prevenibles. Los motivos que subyacen a esta situación son múltiples, pero la realidad es que en el Tercer Mundo

Correspondencia: Dra. M.T. Criado.
Departamento de Microbiología y Parasitología.
Facultad de Farmacia.
Universidad de Santiago de Compostela.
Plaza Seminario de Estudos Galegos, s/n. Campus sur.
15782 Santiago de Compostela. España.
Correo electrónico: mterriado@usc.es

Manuscrito recibido el 15-2-2007; aceptado el 29-8-2008.

existe un gran retraso en la utilización masiva de las vacunas ya comercializadas⁴.

El primer intento de erradicar una enfermedad prevenible data de 1956, cuando la Organización Mundial de la Salud (OMS) se planteó, con éxito, como ya hemos comentado, la erradicación mundial de la viruela, y que se consiguió en 1980 mediante el uso masivo de la vacuna antivariólica. Le siguieron la poliomielitis (desde 2003 están libres de la enfermedad la región de las Américas, la del Pacífico Oeste y la Región Europea), el sarampión (a finales de 2004 la cobertura global de la vacunación era del 76% y muchos países ya habían alcanzado ese objetivo), el tétanos neonatal y la rubéola congénita entre otras.

Desde entonces, han sido muchos los esfuerzos realizados, e importantes los logros conseguidos, en el desarrollo de nuevas vacunas aprovechando los avances en campos como la biología molecular, la tecnología del ADN recombinante, la bioquímica de proteínas, la química de polisacáridos, la bacteriología, virología e inmunológica. Algunos de los aspectos a los que se han aplicado estas nuevas tecnologías han sido la mejora de vacunas ya existentes con el objetivo de incrementar su suministro (como en el caso de la hepatitis B) o su seguridad (como con la vacuna de la tos ferina). Sin embargo, la mayoría de los intentos se han orientado hacia el desarrollo de nuevas vacunas que hasta ahora no habían usando técnicas de vacunología clásica¹.

Inmunización activa: diversas consideraciones

Su objetivo es inducir un estado de inmunidad protectora que en el caso de una vacuna ideal sería de larga duración en todos los vacunados inmunocompetentes, suministrada en una única dosis, y sin efectos secundarios. Aunque esto se ha logrado en pocos casos, la mayoría de las vacunas disponibles, así como aquéllas en desarrollo, están cerca de este ideal. Es esta cercanía lo que sigue estimulando nuevas investigaciones en este campo.

Para decidir la estrategia en el desarrollo de una vacuna *viva* (en la que el microorganismo funciona como un inmunógeno capaz de infectar células y replicarse en el huésped sin causar su enfermedad natural) o *no viva* (un inmunógeno que, por tanto, no puede infectar células), es preciso considerar la epidemiología y la inmunobiología de la infección natural, o la fisiología del patógeno en cuestión, así como la posibilidad técnica de realizar vacunas de un tipo u otro.

La población diana para una vacunación está condicionada por la epidemiología de la enfermedad y por la capacidad de cubrir a la población de riesgo. La edad y el estado de salud de dicha población pueden determinar cuáles son las estrategias de vacunación más apropiadas para obtener una inmunidad protectora.

El estudio de la inmunobiología de la enfermedad en cuestión es muy importante a la hora de identificar el tipo o tipos de inmunidad protectora que se obtendría con la vacuna. En el caso del estudio de una infección particular en humanos, podría mostrar que la desaparición de la infección natural se correlaciona con la aparición de anticuerpos contra un antígeno particular del microorganismo: esto definiría al antígeno como un inmunógeno para

una posible vacuna. Estos estudios se facilitan enormemente y, en algunos casos sólo son posibles desarrollando un modelo experimental de la infección en una especie animal, lo que hace también posible que la vacuna pueda ser probada y optimizada para conseguir una buena eficacia protectora antes de que se lleve a cabo su evaluación clínica en humanos.

Vacunas vivas atenuadas: tecnologías virales y bacterianas clásicas

La mayoría de las vacunas vivas existentes cumple los criterios que se requieren para una vacuna ideal y cuando esto es así, en algunos casos la infección natural causada por el microorganismo de tipo salvaje es eliminada y el sistema inmune queda alertado contra el microorganismo, consiguiéndose así una protección de larga duración. Tales vacunas contienen microorganismos vivos que infectan al huésped de una forma similar a como ocurre en la infección natural, aunque sin la virulencia de ésta y provocando así una respuesta inmune similar a la inducida por el microorganismo de tipo salvaje, durante la infección natural.

La vacuna viva tiene que estar atenuada, lo que implica que la capacidad del microorganismo de causar enfermedad está virtualmente eliminada por las manipulaciones biológicas o técnicas que se realizan durante la preparación de la vacuna. Generalmente, provocan tanto inmunidad humoral (mediada por anticuerpos) como celular (mediada por linfocitos T citotóxicos o linfocitos T de memoria). Es este amplio espectro de inmunidad inducida, así como las sucesivas exposiciones silentes al microorganismo de tipo salvaje (que estimulan la inmunidad), lo que explica la capacidad de estas vacunas de provocar una protección de larga duración.

Aunque estas propiedades *per se* puedan hacer deseable que todas las vacunas activas sean vacunas vivas, no es técnicamente posible para todos los microorganismos patógenos. Una vacuna viva puede estar atenuada de manera incompleta y, por tanto, causar su enfermedad natural en algunos de los vacunados. Además, puesto que puede replicarse, existe la posibilidad de que el microorganismo revierta a su forma patogénica (más natural) o hacerse reactogénica. Es posible también que algunos microorganismos de las vacunas vivas puedan ser transmitidos desde el vacunado, lo que entraña cierto peligro si el receptor tiene alguna inmunodeficiencia o está recibiendo terapia de inmunosupresión.

Las tecnologías clásicas requieren la capacidad de cultivar de modo eficiente el virus, preferiblemente *in vitro*. La primera aproximación clásica consiste en aislar y cultivar un virus animal, que causa una enfermedad veterinaria similar a la humana^{5,6}. El prototipo de vacuna de este tipo, la vacuna de la viruela, fue la primera de la era moderna. En 1798 Jenner observó que los individuos expuestos de manera intencionada al virus de la viruela vacuna eran resistentes a la viruela humana. El programa de vacunación seguido fue utilizado en todo el mundo usando lotes de virus de la viruela vacuna que fueron mayoritariamente cultivados *in vivo*. Se consiguió así la total erradicación de esta enfermedad en todo el mundo hacia la mitad de la década de 1970, la única enfermedad infeccio-

sa erradicada desde entonces, lo que supone un tributo a la medicina moderna, a una estrategia de control efectiva y al esfuerzo de innumerables investigadores. Como resultado, esta vacuna tiene la distinción de haber sido retirada, meta final de cualquier vacuna.

La segunda estrategia clásica, la atenuación en cultivos celulares, fue posible a partir de la década de 1940, con la puesta a punto de las técnicas de cultivos celulares y la capacidad de propagar el virus en estos cultivos, con el fin de atenuar su patogenicidad por medio de “pases” en células o en condiciones de crecimiento que los virus normalmente no encuentran *in vivo*^{7,8}. Para mejorar la eficacia de algunas vacunas, como la del rotavirus animal, se han desarrollado virus reasociados (“*reassortant*”, con genomas mixtos procedentes de cepas distintas), una técnica sólo aplicable a virus con genomas fragmentados y que se obtienen tras una coinfección de un cultivo con dos virus diferentes, habitualmente uno animal y otro humano de forma que los virus resultantes contienen segmentos de genes de los dos virus parentales^{9,10}. Se aíslan entonces, los rotavirus que contengan mayoritariamente genes del rotavirus animal, junto con genes del rotavirus humano que sean importantes para la protección, obteniéndose así fenotipos atenuados para humanos. Estos rotavirus reasociados son más adecuados como candidatos a vacunas que sus virus animales parentales no recombinantes. La misma estrategia ha sido aplicada a las vacunas de la gripe, en la que, el virus virulento proporciona los genes que codifican las glucoproteínas de superficie inmunogénicas y un virus atenuado aporta la mayoría de los genes y, con ellos, el fenotipo de atenuación¹¹.

La única vacuna bacteriana viva disponible que se basa en pases seriados es la de la tuberculosis, que consiste en la cepa atenuada viva de *Mycobacterium bovis* conocida como bacilo de Calmette-Guérin (BCG). A comienzos del siglo XX, esta cepa bovina se atenuó mediante 231 subcultivos sucesivos *in vitro* a lo largo de 13 años¹². Hay muchas cepas de este bacilo disponibles en el mundo, derivadas de la cepa original, que difieren en términos de tolerabilidad, inmunogenicidad y grado de eficacia protectora en ensayos clínicos. Las vacunas han sido inyectadas a más de un billón de personas en todo el mundo y han mostrado, en general, unos perfiles aceptables en cuanto a su tolerabilidad. Con otros patógenos bacterianos sólo ha sido posible dicha atenuación por subcultivos en *Salmonella typhi* (cepa Ty21a) con una eficacia de protección cercana al 70% frente a la fiebre tifoidea¹³.

Vacunas muertas

Presentan cierto tipo de ventajas sobre las vacunas vivas que, en cierta manera, contrarrestan algunos de los defectos que éstas puedan presentar. Por definición, en estas vacunas, el patógeno no puede multiplicarse o diseminarse para causar la enfermedad. Generalmente, son mejor toleradas, especialmente aquellas constituidas por componentes microbianos purificados (vacunas de subunidades). Suelen ser menos inmunogénicas que las vivas, lo que implica, en ocasiones, la necesidad de aumentar su inmunogenicidad combinándolas con un adyuvante. Los únicos aprobados para uso humano son el hidróxido de aluminio (que ha sido ya utilizado en vacunas inyectadas en más de mil millones de personas en todo el mundo) y el

MF59 y AS04 (MPL/hidróxido de aluminio), cuya seguridad ha sido demostrada recientemente^{14,15}. Cualquier programa de desarrollo para una vacuna muerta debe ser llevado a cabo teniendo en cuenta que, en general, son necesarias dosis múltiples, a veces seguidas de dosis de recuerdo para conseguir una inmunidad protectora a largo plazo. Estas normalmente funcionan estimulando la respuesta inmune humoral y activando la memoria inmunológica.

Las aproximaciones más antiguas a las vacunas muertas, que son similares a las estrategias clásicas seguidas para las vacunas vivas discutidas anteriormente, se basan en la inactivación de bacterias o virus enteros con el fin de provocar la síntesis de anticuerpos contra los muchos inmunógenos que tienen. Las vacunas bacterianas inactivadas aprobadas se desarrollaron hace ya varias décadas, en un momento en el que no se conocían los antígenos bacterianos y su papel específico en la inmunidad. Dado el número de tecnologías alternativas disponibles para preparar vacunas purificadas, bioquímicamente definidas, y los estrictos estándares reguladores que se han ido imponiendo con el tiempo, parece improbable que aparezcan nuevas vacunas bacterianas muertas fabricadas de esta manera.

Las vacunas virales inactivadas, también preparadas por tecnologías clásicas, están disponibles desde hace varias décadas y, generalmente, son bien toleradas. Los epítopos clave de la superficie de muchos virus pequeños, que generan respuestas inmunes protectoras (epítopos protectores), frecuentemente son muy conformacionales. Para la mayoría de los virus para los que existen vacunas inactivadas, puede no ser posible imitar la conformación de tales epítopos por otras tecnologías que se describirán posteriormente (p. ej., polipéptidos recombinantes). Por tanto, esta estrategia clásica que tiene un excelente récord en la producción de vacunas eficaces sigue siendo la tecnología de elección para muchas vacunas virales^{16,17}.

Como es bien sabido, muchos patógenos, especialmente las bacterias, tienen una cápsula externa compuesta de polisacáridos. En estas bacterias, los anticuerpos dirigidos contra el polisacárido capsular pueden ser protectores contra la infección, por lo que se supone que son buenos antígenos vacunales.

El defecto de estas vacunas es que los polisacáridos, al ser inmunógenos independientes de células T, son poco o nada inmunogénicos en niños menores de 2 años a causa del estado inmaduro de su sistema inmunitario y no inducen memoria inmunológica en niños mayores y adultos. Ejemplos típicos de estas vacunas son las empleadas contra meningococos (serogrupos A, C, Y, W₁₃₅) y neumococos¹⁸⁻²⁰.

Inmunización pasiva

En algunas situaciones es necesaria una protección inmunológica inmediata para tratar una enfermedad infecciosa. Como la inyección con una vacuna activa tarda entre 1 y 2 semanas en comenzar a producir una respuesta, una preparación de anticuerpos con un efecto protector contra un patógeno podría ser eficaz si se administrara en el momento o muy pronto desde que se sospecha o se conoce la exposición a un patógeno.

Algunos ejemplos incluyen la profilaxis tras la exposición al virus de la hepatitis B²¹ o al virus de la varicela-zóster, la administración a madres embarazadas que sean

virémicas para citomegalovirus con el fin de prevenir infecciones perinatales^{22,23}, y la profilaxis preexposición para individuos de riesgo con otras patologías (que han sido sometidos a un trasplante con citomegalovirus, lactantes con patologías pulmonares por el virus respiratorio sincitial, pacientes con sepsis por *Pseudomonas*²⁴, y pacientes tratados de cáncer²⁵). El efecto protector mediado por la mayoría de estas preparaciones de anticuerpos consiste en neutralizar el patógeno o unirse a la célula afectada, que es entonces destruida.

Las primeras preparaciones de anticuerpos o inmunoglobulinas que fueron efectivas para la terapia antimicrobiana aguda estaban obtenidas de especies como los caballos, inyectados con las toxinas bacterianas inactivadas. Aunque estos antisueros eran efectivos, al ser los anticuerpos extraños provocaban efectos adversos graves en los receptores, tales como la enfermedad del suero. Por esta razón no suelen administrarse, a menos que haya una emergencia para la que no exista una terapia alternativa.

Las nuevas vacunas

Las modernas estrategias de desarrollo de vacunas abarcan a todas las vacunas activas, vivas y muertas, virales o bacterianas, así como a los preparados de inmunoglobulinas específicas entre los que se incluyen los anticuerpos monoclonales. Para muchos patógenos, en los que una proteína concreta contiene epitopos protectores, el desarrollo de una vacuna basada en esa proteína purificada es la estrategia de elección, suponiendo que una vacuna formada por el patógeno completo inactivado no sea efectiva o técnicamente posible. Estas vacunas basadas en proteínas requieren el uso de técnicas inmunológicas, genéticas y bioquímicas para su desarrollo²⁶⁻²⁸.

Las tecnologías modernas han llevado a la formulación de un paradigma en la investigación de vacunas en el que los microorganismos se analizan *a priori* desde el punto de vista de las características de su genoma y/o su proteoma para identificar los factores que, teóricamente, estarían implicados en su virulencia o en la respuesta inmune, y que puedan ser adecuados como candidatos vacunales.

Tecnología del ADN recombinante

Uno de los avances más considerables en este sentido son las tecnologías del ADN recombinante, que no es más que la aplicación de un conjunto de métodos de ingeniería genética, es decir, de métodos que nos permitan modificar deliberadamente la información genética de una célula.

Utilización de vectores vacunales

Dos son las estrategias en las que la tecnología del ADN recombinante se ha aplicado al desarrollo de nuevas vacunas virales vivas:

- La primera consiste en provocar mutaciones específicas o deleciones en el genoma viral, para lograr que los virus atenuados sean estables, esto es, incapaces de revertir al fenotipo de virulencia. La mayor estabilidad del fenotipo de atenuación se consigue induciendo modificaciones lo suficientemente amplias como para que la reversión pueda ser descartada, lo que puede ocurrir con los virus atenuados obtenidos por estrategias clásicas que

pueden tener solamente mutaciones esporádicas y, por ello, tener la capacidad de revertir.

- La segunda aproximación ha sido la fabricación de virus que sirvan como portadores (o vectores de expresión) de inmunógenos o epitopos peptídicos de otros patógenos humanos con el objetivo de conseguir la presentación del inmunógeno al sistema inmunitario en el contexto de un virus vivo, de tal forma que el sistema inmunitario responde igual que a un inmunógeno vivo y, por tanto, desarrolla una inmunidad muy amplia (humoral, celular o ambas). Como parte de un virus vivo, dicho inmunógeno es expresado dentro del citoplasma de la célula infectada, y como consecuencia de los mecanismos de presentación antigénica, se rompe en fragmentos que son transportados a la superficie de la célula, donde provoca la respuesta de los linfocitos T citotóxicos. El prototipo del vector viral más usado es el virus de la viruela vacuna. Para fabricarlo como un vector, se crea un plásmido que contiene el gen para un inmunógeno extraño y se inserta en el genoma de un virus vacunal, dando lugar de ese modo a un virus de la vacuna recombinante que expresa el inmunógeno. Actualmente se están desarrollando vectores de expresión con cepas de adenovirus que ya han sido usadas como vacunas para prevenir enfermedades respiratorias en personal militar o el sida²⁹, aunque todavía no se han obtenido resultados positivos en este último caso.

Dada la mayor complejidad de los genomas bacterianos respecto a los genomas virales, la ingeniería genética de las bacterias se ha desarrollado más lentamente. El enfoque técnico, similar a lo ya comentado, ha sido dirigido hacia el uso de la tecnología del ADN recombinante para conseguir la atenuación de cepas bacterianas vivas o para crear vectores bacterianos vivos. En general, la obtención de mutantes atenuados sigue la estrategia de identificar el gen o genes responsables de la virulencia de la bacteria y eliminarlos, anular su expresión o modularla *in vivo*, hasta el punto de conseguir la atenuación de la virulencia del microorganismo. Como ocurre en los virus atenuados, ha de haber un equilibrio entre la virulencia de la cepa bacteriana atenuada y su actividad como vacuna, lo que significa que no se debe sobreatenuar la cepa hasta el punto de que ya no se replique suficientemente como para provocar una respuesta inmune efectiva. Por ejemplo, una infección por *Vibrio cholerae*, protege contra infecciones posteriores, por lo que las vacunas para dicho patógeno han sido desarrolladas como vacunas vivas³⁰. La atenuación de esta cepa de *Vibrio* (como la de otras muchas cepas bacterianas) se consigue por la deleción (dirigida por el ADN recombinante) de genes que codifican factores de virulencia tales como las toxinas.

Al igual que con los virus, también están siendo fabricadas bacterias que funcionen como vectores vivos para la expresión de inmunógenos de otros patógenos^{31,32}. Un ejemplo es *Salmonella typhimurium*, que se replica en el intestino y sirve como vector para antígenos de microorganismos que también se replican en el intestino, como *V. cholerae* y *Escherichia coli* o para otros patógenos no intestinales como *Clostridium tetani*.

Mycobacterium bovis también ha sido convertido en un vector vivo para expresar genes extraños, incluyendo varios de VIH-1³³. El uso de esta cepa como un vector de vacuna parenteral es aceptable en función de su excelente to-

lerabilidad demostrada después de décadas de uso en todo el mundo como vacuna contra la tuberculosis. La habilidad de este y otros vectores bacterianos para replicarse intracelularmente puede aumentar la capacidad de provocar respuestas inmunes celulares contra los patógenos correspondientes al inmunógeno clonado en ellos. Es posible pues, en la actualidad, seleccionar genes bacterianos o virales e inactivarlos para mejorar la seguridad de vectores vivos o para identificar antígenos potencialmente útiles como inmunógenos.

Vacunas de subunidades proteicas

Gracias a esta modificación deliberada de la información genética de un microorganismo, se han podido producir vacunas de subunidades, como la que utiliza un antígeno de superficie altamente purificado contra la hepatitis B, o la que emplea tres proteínas puras, contra *Bordetella pertussis*. En este último caso se emplearon también técnicas de estudio de la relación estructura/función para producir toxina alterada genéticamente con el fin de evitar la toxicidad y mantener inalterada la conformación antigénica.

La primera aplicación de la tecnología del ADN recombinante a la producción de una vacuna fue para la hepatitis B. Dado el precedente de que una proteína antigénica de superficie del virus, denominada HBsAg, obtenida a partir del plasma de individuos infectados, es una vacuna eficaz y bien tolerada, la estrategia empleada desde finales de la década de 1970 fue clonar y secuenciar el genoma del virus, identificar el gen que codifica para dicho antígeno y expresarlo en una célula heteróloga. Los intentos de conseguirlo en *E. coli* no funcionaron, pero sí en *Saccharomyces cerevisiae* y en otras células eucariotas. En ambos casos, dicha proteína antigénica se aísla con gran pureza y se adsorbe a sales de aluminio para fabricar vacunas que están aprobadas desde finales de la década de 1980³⁴.

También se están llevando a cabo investigaciones y aplicaciones de la tecnología del ADN recombinante para producir otras proteínas que, una vez purificadas, se han formulado en vacunas que en la actualidad están siendo evaluadas clínicamente para aplicaciones profilácticas y terapéuticas en situaciones tan importantes como es el caso del sida³⁵. Con técnicas similares, también se están desarrollando vacunas muertas recombinantes frente a parásitos como esquistosomas o el de la malaria^{36,37}.

En cuanto a los toxoides (toxina proteica inactivada), el proceso químico para su obtención tiene varias desventajas respecto a la alteración por desnaturalización de los epitopos protectores y la posibilidad de que el toxoide revierta a una forma biológicamente activa. En el caso de la toxina diftérica, el gen ha sido clonado y secuenciado y los codones esenciales para la bioactividad de la toxina han de ser necesariamente mutados²⁸. El gen alterado sustituye al nativo en el microorganismo parental o en uno heterólogo como *E. coli* (si es técnicamente factible producir en él la proteína), que entonces produce un toxoide inmunogénico pero inactivado de forma estable.

Vacunas de ácidos nucleicos

Otra de las últimas tecnologías para el desarrollo de vacunas inactivadas es el uso directo como vacuna, de preparaciones purificadas de ácidos nucleicos que codifican un inmunógeno protector^{38,39}.

Si *in vivo* las células pudieran incorporar ácidos nucleicos que codifiquen antígenos vacunales, lo que ya se ha conseguido *in vitro*, esos antígenos podrían secretarse o asociarse con la superficie celular de tal forma que iniciaran una respuesta inmune. Una estrategia ha sido inyectar intramuscularmente ADN o ARNm que codifique un antígeno vacunal. Las células toman el ácido nucleico y sintetizan el antígeno induciendo respuestas inmunes. Las ventajas de usar ADN son la facilidad técnica de preparación y la capacidad de que dirija la síntesis de múltiples copias de ARNm, dando lugar a una amplificación de la síntesis del antígeno y de la respuesta inmune. El uso de ARNm tiene la ventaja teórica de ser incapaz de integrarse en el ADN cromosómico y, por tanto, no altera genéticamente la célula. Una segunda estrategia ha sido la incorporación del ADN en microproyectiles (bolas de metal) que son “disparados” directamente dentro de las células. Estas aplicaciones están todavía en sus primeras etapas de desarrollo, pero si resultaran ser útiles ofrecen oportunidades únicas para nuevas vacunas.

Vacunas conjugadas

Además de la tecnología del ADN recombinante, como ya se ha mencionado al principio de la exposición, se han desarrollado otras técnicas que, bien por sí solas o en combinación con dichas tecnologías son aplicables a la preparación de vacunas. Una de ellas es la conjugación de macromoléculas, consistente en la unión covalente de un inmunógeno concreto con una proteína portadora, por métodos químicos. Su objetivo es el de convertir antígenos débilmente inmunogénicos, como los péptidos, o que no inducen una respuesta adecuada, como los polisacáridos, en inmunógenos efectivos.

La conjugación se ha usado con gran éxito en el desarrollo de la vacuna contra *Haemophilus influenzae*, incluida ya en el calendario vacunal en muchos países. Se ha llevado a cabo uniendo el polisacárido capsular de *H. influenzae* tipo B con el toxoide diftérico, CMR197, consiguiéndose una vacuna efectiva en niños desde los 2 meses de edad y que induce memoria inmunológica. También se están desarrollando vacunas conjugadas con los polisacáridos de estreptococos y de meningococos^{40,41}, aunque ya se utiliza una vacuna conjugada que cubre siete serogrupos en el caso del neumococo y del polisacárido del meningococo C que ha dado un excelente resultado y ha sido también incluida en los calendarios vacunales. La conjugación es útil, también, para incrementar la inmunogenicidad de epitopos peptídicos lineales, que son de por sí poco inmunogénicos, conjugando péptidos sintéticos u obtenidos por técnicas de ADN recombinante, con portadores proteicos como el toxoide del tétanos.

Tecnologías avanzadas en el desarrollo de vacunas

Dos categorías de técnicas muy prometedoras son la secuenciación automática del ADN y la bioinformática, que, conjuntamente han revolucionado la biología y la medicina. Actualmente se puede conseguir la secuencia completa del genoma de una bacteria en muy poco tiempo⁴², hasta el punto de que hoy en día hay más de 750 genomas de microorganismos secuenciados, cubriendo la mayoría de los patógenos importantes para el hombre. Por su parte, la bioinformática es esencial para poder interpretar la in-

mensa cantidad de información que proporciona el conocimiento de estos genomas.

Otras estrategias complementarias son las denominadas de "genómica funcional", que permiten el análisis a gran escala de la transcripción genética usando tecnologías de micromatrices (*microarrays*) de ADN o de ARN, el análisis del conjunto de proteínas de un organismo o proteómica (empleando electroforesis 2D y espectrometría de masas) y las tecnologías de comparación genoma-proteoma^{43,44}.

En el primero de los casos, las micromatrices de ADN constituyen una tecnología genómica desarrollada recientemente y uno de los instrumentos más potentes para el estudio del transcriptoma o proteoma, el conjunto de los transcritos de un organismo, hasta el punto de que su uso está revolucionando la investigación biológica, el diagnóstico clínico y el descubrimiento de vacunas.

En el segundo de los casos, los avances en las técnicas de separación de proteínas, junto con la espectrometría de masas, han permitido la identificación del conjunto de las proteínas de una población celular. Una de las áreas que abarca la proteómica es la identificación a gran escala de las proteínas y sus modificaciones tras la traducción; la segunda es la comparación diferencial, para analizar variaciones en los niveles de expresión de proteínas, y una tercera abarca el estudio de las interacciones entre proteínas. Estas tres aplicaciones, junto con la caracterización de las proteínas de membrana y de las asociaciones a la superficie, su combinación con técnicas de inmunoproteómica, y los análisis por tecnologías bioinformáticas, son especialmente importantes en el desarrollo de vacunas.

Las técnicas de proteómica comparativa están siendo utilizadas para el desarrollo de vacunas, sobre la base de que los antígenos presentes sólo en las cepas virulentas serán los más adecuados. En este sentido, se están haciendo estudios con *Mycobacterium tuberculosis* (comparando su proteoma con el de *M. bovis*), *Helicobacter pylori*, *Listeria*, *Streptococcus* y *Campylobacter*. También se han empleado técnicas de hibridación comparativa (denominadas CGH) con *Streptococcus* y *M. tuberculosis*, permitiendo identificar qué genes sufren mayor variabilidad y cuáles son los más conservados y, que, teóricamente serán los mejores candidatos vacunales. Esta técnica también ha permitido detectar la ausencia de algunos genes importantes en las cepas vacunales actuales de algunas especies.

Otras estrategias interesantes que se han empleado son las denominadas tecnologías de expresión *in vivo* (IVET) para la identificación de genes de virulencia, claves en el diseño de vacunas⁴⁵. Esta técnica tiene la ventaja de revelar mutantes atenuados que podrían ser usados como vacunas vivas, y las proteínas identificadas como esenciales para la infección, que es muy probable que sean buenos candidatos para vacunas de subunidades.

En 1995, la disponibilidad de la secuencia del genoma completo de un microorganismo⁴⁶ marcó el principio de una era genómica que ha permitido cambiar los métodos tradicionales establecidos por Pasteur (aislamiento, inactivación e inyección del agente causal de la enfermedad) e iniciar la aproximación al desarrollo de vacunas partiendo de la información genómica en un proceso denominado vacunología reversa que podría considerarse uno de los ejemplos más importantes de cómo la información genómica

puede ser utilizada a la hora de elaborar nuevas medidas terapéuticas⁴⁷.

Esta tecnología, que supone un enorme ahorro de tiempo y permite incluso la identificación de antígenos que no puedan ser purificados en cantidades adecuadas de forma convencional, va a permitir el desarrollo de vacunas muy difíciles o imposibles de obtener utilizando la vacunología clásica, ya que no está basada en el cultivo del microorganismo, sino en la utilización de algoritmos para minar la información contenida en su mapa genético, lo que es especialmente útil en dos situaciones:

- Cuando la enfermedad está causada por microorganismos que no se pueden cultivar en el laboratorio, como es el caso del virus de la hepatitis C o de *Treponema pallidum*.

- Cuando la enfermedad es causada por organismos que sufren gran variación antigénica, y la vacuna protege sólo contra la cepa utilizada para desarrollarla, por lo que no es universal. Ejemplos de este tipo son el VIH, el gonococo o el meningococo B.

Tomando como punto de partida la secuencia genómica del patógeno, que puede ser considerada como un catálogo de todas las proteínas que la bacteria puede expresar en cualquier momento de su ciclo vital y mediante análisis informáticos, la vacunología reversa predice cuáles son los antígenos con mayores posibilidades de servir como candidatos para el desarrollo de vacunas, asumiendo de entrada que todos ellos son inmunogénicos y sin tener en cuenta su abundancia o inmunogenicidad durante la infección, lo que permite la identificación no sólo de los antígenos observados mediante métodos tradicionales, sino también de otros que funcionan de modos completamente diferentes, permitiendo el descubrimiento de nuevos métodos de intervención inmune. La utilidad de esta aproximación depende en gran medida de la disponibilidad de un sistema de alto rendimiento para la comprobación de la existencia de inmunidad protectora. Si esto es así, teóricamente, todos los genes del patógeno pueden ser comprobados sin ningún tipo de sesgo.

Desafortunadamente, debido a las limitaciones que existen actualmente en el conocimiento de la inmunidad vacunal, para algunas enfermedades no es fácil encontrar buenos marcadores de protección (no así para otras, como la hepatitis B y la A, la difteria o el tétanos) de modo que el cribado o rastreo de inmunidad protectora es el paso limitante en la vacunología reversa⁴⁸. El otro gran problema de este método es su incapacidad para identificar, entre otros, antígenos no proteicos como los lipopolisacáridos, que son un componente importante de muchas vacunas efectivas.

En conclusión, la vacunología reversa permite nuevas aproximaciones muy interesantes haciendo posible el desarrollo de vacunas basadas en epitopos derivados del genoma completo, por lo que, en teoría, se podría diseñar una vacuna totalmente sintética que contuviese cadenas de los mejores epitopos codificados por el microorganismo, pudiendo excluirse aquellos poco inmunogénicos o que muestren potencialmente reactividad cruzada con otros del propio organismo. Con el avance de la era genómica se ha hecho evidente que el análisis genómico de múltiples cepas es fundamental para el desarrollo de vacunas uni-

TABLA 1. Comparación de los métodos convencional y genómico para el desarrollo de vacunas

Vacunología convencional	Vacunología reversa
Características fundamentales	
<ul style="list-style-type: none"> – Antígenos más abundantes durante la enfermedad – Antígenos inmunogénicos durante la enfermedad – Microorganismos cultivables – Esencial el uso de modelos animales – Los indicadores de protección son útiles 	<ul style="list-style-type: none"> – Todos los antígenos inmunogénicos durante la enfermedad – Antígenos no inmunogénicos durante la enfermedad – Antígenos de microorganismos no cultivables – Esencial el uso de modelos animales – Los indicadores de protección son muy importantes – El plegamiento adecuado de las proteínas recombinantes es importante – Los métodos de alto rendimiento para la expresión y el análisis son importantes
Ventajas	
<ul style="list-style-type: none"> – Los polisacáridos pueden ser utilizados como antígenos – Son posibles las vacunas basadas en lipopolisacáridos – Los glucolípidos y otros antígenos restringidos por CD-1 pueden ser utilizados 	<ul style="list-style-type: none"> – Acceso rápido a cualquier antígeno individual – Se pueden utilizar microorganismos no cultivables – Se pueden identificar antígenos no abundantes – Se pueden identificar antígenos no inmunogénicos durante la infección – Se pueden identificar antígenos expresados de modo temporal durante la infección – Se pueden identificar antígenos no expresados <i>in vitro</i> – Se pueden utilizar proteínas no estructurales
Desventajas	
<ul style="list-style-type: none"> – Se necesita mucho tiempo para la identificación de los antígenos – Variabilidad antigénica de muchos de los antígenos identificados – Los antígenos no identificados <i>in vitro</i> no pueden ser identificados – Sólo se consideran las proteínas estructurales 	<ul style="list-style-type: none"> – No se pueden utilizar antígenos no proteicos (polisacáridos, lipopolisacáridos, glucolípidos y otros antígenos restringidos por CD-1)

versales. La inclusión del genoma de varios representantes de cada especie ha dado lugar a lo que se conoce como aproximación genómica⁴³, con gran potencial para el desarrollo de vacunas.

Los datos genómicos, por sí solos, no pueden ser utilizados para predecir adecuadamente la eficacia *in vivo* de los antígenos candidatos, por tanto, los seleccionados en función de criterios bioinformáticos han de ser validados utilizando aproximaciones genómicas, proteómicas, genéticas y bioquímicas, además de los modelos informáticos adecuados (tabla 1).

Inmunización pasiva: anticuerpos monoclonales y anticuerpos catalíticos

En este campo también se han desarrollado nuevas tecnologías importantes que tienen, además, aplicación en otras áreas de la biología y la medicina. Las más destacadas son la construcción de hibridomas y la producción de anticuerpos monoclonales⁴⁹. Los hibridomas (obtenidos al fusionar células de mieloma con células de bazo de animales inmunizados o linfocitos humanos) seleccionados para los anticuerpos que interesen, se inyectan en animales de laboratorio, en los que se reproducen como tumores y producen anticuerpos que responden a un único antígeno del inmunógeno utilizado inicialmente, esto es, anticuerpos derivados de un solo clon de células B o anticuerpos monoclonales (AcMo).

El uso de AcMo para la inmunización pasiva ofrece las ventajas de evitar la fuente humana para las inmunoglobulinas, de aumentar enormemente la tolerabilidad de

las inmunoglobulinas al reducir sustancialmente el contenido proteico y de proporcionar una fuente de anticuerpos ilimitada con una estandarización absoluta y una especificidad única. Estos factores hacen muy probable que los AcMo reemplacen a las inmunoglobulinas humanas policlonales como vacunas pasivas. Se pueden considerar tres clases de este tipo de vacunas:

a) AcMo humanos naturales, que resultan en la creación y el aislamiento de hibridomas que segreguen AcMo humanos.

b) AcMo humanos recombinantes, obtenidos por recombinación a partir de un hibridoma que produzca un AcMo humano natural.

c) AcMo recombinantes humanizados, obtenidos a partir de hibridomas en los que la humanización se consigue reemplazando las regiones variables de los genes humanos por las correspondientes de genes murinos.

Otra tecnología reciente utilizada en inmunización pasiva es la de obtención de anticuerpos catalíticos o inmunotoxinas, esto es, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos covalentemente a un agente citotóxico. Como el anticuerpo es específico de un antígeno particular, sólo se unirá a las células que lo expresen en su superficie, y son especialmente útiles para el tratamiento de ciertos cánceres, problemas de autoinmunidad, enfermedades virales y trasplantes de tejidos. Los compuestos tóxicos conjugados a los anticuerpos incluyen drogas, toxinas, radionúclidos, citocinas y enzimas.

Ya que muchas drogas usadas en estas inmunotoxinas afectan a procesos intracelulares, éstas deben ser capaces

no sólo de unirse a la superficie de la célula, sino también de llevar el agente tóxico a su interior. Una vez dentro de la célula, la toxina ha de ser liberada del anticuerpo. En el caso de sustancias químicas orgánicas esto se logra bien por la acción de vesículas endocíticas y lisosomas, donde el anticuerpo es degradado y liberada la droga, o por el diseño de enlazadores que se puedan romper enzimáticamente o químicamente.

Otras aplicaciones de las vacunas

Además de las vacunas contra enfermedades infecciosas, son especialmente notables las aplicaciones de las nuevas tecnologías de obtención de proteínas recombinantes para vacunas contra otras patologías como las alergias, enfermedades autoinmunes, prevención del embarazo o el cáncer⁵⁰⁻⁵².

Puesto que está claramente demostrado que los extractos crudos de alérgenos, tales como las gramíneas, pueden ser usados terapéuticamente para mejorar los síntomas alérgicos, los genes que codifican un alérgeno concreto pueden clonarse y expresarse en una célula heteróloga. Esto es extrapolable a otros alérgenos importantes, lo que daría lugar a la producción de un cóctel de alérgenos definidos para formular vacunas que podrían ser más efectivas y mejor toleradas que las vacunas brutas actualmente disponibles.

Otra aplicación novedosa se encuentra en el campo de la fertilidad humana. Una proteína de la superficie del esperma de cobayas se purificó, se mezcló con adyuvantes y se inyectó en cobayas hembras. Los animales vacunados se volvieron estériles, aunque posteriormente recuperaron la fertilidad tras períodos de alrededor de 1 año después de la vacunación. Este resultado ha abierto una vía hacia la estrategia de clonar y expresar los genes que codifiquen la proteína análoga del esperma humano para usarla como una vacuna de fertilidad reversible.

Del mismo modo, se han clonado inmunógenos específicos de células cancerosas para desarrollar vacunas (o inmunotoxinas, como ya hemos comentado) capaces de eliminar específicamente las células tumorales.

Conclusiones

Los desarrollos tecnológicos logrados en los últimos 15 años han mostrado que el número de estrategias para lograr nuevas vacunas se está incrementando de modo considerable. Se puede predecir que en los próximos años se seguirá progresando y, los aspectos técnicos serán refinados de tal forma que casi cualquier antígeno o epítipo podrá ser presentado en una forma altamente inmunogénica en el contexto de una vacuna viva o muerta. El mayor conocimiento de la función de los genes en patógenos virales y bacterianos permitirá estabilizar y atenuar mejor las vacunas vivas y usarlas como vectores vivos. La tecnología de adyuvantes debería avanzar hasta el punto de que puedan utilizarse adyuvantes más potentes y tan bien tolerados como las sales de aluminio.

A medida que las investigaciones avancen, es probable que el conocimiento de la inmunología siga siendo el factor limitante para el desarrollo de nuevas vacunas para uso humano. Algunas áreas en las que el avance en nuestros

conocimientos tendrían un resultado práctico en el desarrollo de vacunas son la inmunobiología de los patógenos, el tipo preciso de respuesta inmune que se requiere para una protección sólida y persistente contra la infección y la enfermedad, la consecución de la inmunidad de las mucosas y el diseño de estrategias de vacunación óptimas para conseguir dicha protección.

Bibliografía

- Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 4th ed. Oxford: Saunders; 2003.
- Jiménez J. Vaccines: a wonderful tool for equity in health. *Vaccine*. 2001; 19:2201-5.
- Liu MA. Vaccines in the 21st century. *Western J Med*. 1999;171:319-22.
- André FE. Vaccinology: past achievements, present roadblocks and future promises. *Vaccine*. 2003;21:593-5.
- Sabin AB, Boulger LR. History of Sabin attenuated poliovirus vaccine. *J Biol Stand*. 1973;1:115-8.
- Takahashi M, Okuno Y, Otsuka T. Development of a live attenuated varicella vaccine. *Biken J*. 1975;18:25-33.
- Henderson DA. Smallpox eradication. *Proc R Soc Lond*. 1977;199:83-97.
- Clark HF, Borian FE, Bell LM. Protective effect of WC3 vaccine against rotavirus diarrhea in infants during a predominantly serotype 1 rotavirus season. *J Infect Dis*. 1988;158:570-87.
- Clark HF, Offit PA, Ellis RW. The development of multivalent bovine rotavirus (strain CW3) reassortant vaccine for infants. *J Infect Dis*. 1996;174: S73-80.
- Rennels MB, Glass RI, Dennehy PH. Safety and efficacy of a high-dose Rhesus-human reassortant rotavirus vaccine – Report of the national multicenter analysis. *Pediatrics*. 1996;97:7-13.
- Ghendon YZ, Klimov AI, Alexandrova GI, Polezhaev FI. Analysis of genome composition and reactogenicity of recombinants of cold-adapted and virulent virus strains. *J Gen Virol*. 1981;53:215-24.
- Guérin C. The history of BCG. En: Rosenthal SR, editor. *BCG vaccination against tuberculosis*. Boston: Little, Brown & Co.; 1957. p. 48-53.
- Germanier R, Furer E. Isolation and characterization of ga/E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live, oral typhoid vaccine. *J Infect Dis*. 1975;131:553-8.
- Podda A, Del Giudice G. MF59 adjuvanted vaccines: increased immunogenicity with an optimal safety profile. *Expert Rev Vaccines*. 2003;2:197-203.
- Aguilar JC, Rodríguez EG. Vaccine adjuvants revisited. *Vaccine*. 2007;25: 3752-62.
- Murdin AD, Barreto L, Plotkin S. Inactivated polio vaccines: past and present experience. *Vaccine*. 1996;14:735-46.
- Provost PJ, Hughes JV, Miller WJ. An inactivated hepatitis A viral vaccine of cell culture origin. *J Med Virol*. 1986;19:23-31.
- Gotschlich EC, Lyu TY, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and group C meningococcal polysaccharides. *J Exp Med*. 1969;129: 1349-65.
- Klein D, Ellis RW. Pneumococcal conjugate vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, editors. *New generation vaccines*. New York: Marcel Dekker; 1997. p. 503-26.
- Knistern PJ, Marburg S, Ellis RW. *Haemophilus influenzae* type b conjugate vaccines. En: Powell M, Newman M, editors. *Vaccine design: the subunit approach*. New York: Plenum Publishing; 1995. p. 673-94.
- Seehofer D, Berg T. Prevention of hepatitis B recurrence after liver transplantation. *Transplantation*. 2005;80:S120-4.
- Halwachs-Baumann G. The congenital cytomegalovirus infection: virus-host interaction for defense and transmission. *Curr Pharm Biotechnol*. 2006;7: 303-12.
- Kourtis AP, Duerr A. Prevention of perinatal HIV transmission: a review of novel strategies. *Expert Opin Investig Drugs*. 2003;12:1535-44.
- Mine Y, Kovacs-Nolan J. Chicken egg yolk antibodies as therapeutics in enteric infectious disease: a review. *J Med Food*. 2002;5:159-69.
- Kuroki M, Huang J, Shibaguchi H, Tanaka T, Zhao J, Luo N, et al. Possible applications of antibodies or their genes in cancer therapy. *Anticancer Res*. 2006;26:4019-25.
- Hillerman MR, Bertalan AU, Buynak EB. Clinical and laboratory studies of HBsAg vaccine. En: Vyas GN, Cohen SN, Schmid R, editors. *Viral hepatitis*. Philadelphia: Franklin Institut Press; 1978. p. 525-41.
- Chazono M, Yoshida I, Konobe T. The purification and characterization of an acellular pertussis vaccine. *J Biol Stand*. 1988;16:83-9.

28. Giannini G, Rappouli R, Ratti G. The amino acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM₄₅ and CRM₁₉₇. *Nucleic Acid Res.* 1984;12:4063-9.
29. Perales MA, Schwartz DH, Fabry JA, Lieberman J. A vaccinia-gp160-based vaccine but not a gp160 vaccine elicits anti-gp160 cytotoxic T lymphocytes in some HIV-1 seronegative vaccinees. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol.* 1995;10:27-35.
30. Butters J, Beattie DT, Gardel CL. Heterologous antigen expression in *Vibrio cholerae* vector strains. *Infect Immun.* 1995;63:2689-96.
31. Chatfield SN, Fairweather NF, Charles IG, Pickard D, Levine MM, Hone D, et al. Construction of a genetically defined *Salmonella typhi* Ty2 aroA, aroC mutant for the engineering of a candidate oral typhoid-tetanus vaccine. *Vaccine.* 1992;10:53-60.
32. Goossens PL, Montixi C, Saron MF. *Listeria monocytogenes*: a live vector able to deliver heterologous proteins within the cytosol and to drive a CD8-dependent T-cell response. *Biologicals.* 1995;23:135-43.
33. Stover CK, De la Cruz VF, Fuerst TR, Burlein JE, Benson LA, Bennett LT, et al. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature.* 1991;351:456-60.
34. Yap SF. Hepatitis B: review of development from the discovery of the "Australia Antigen" to the end of the twentieth Century. *Malays J Pathol.* 2004;26:1-12.
35. Dale CJ, Thomson S, De Rose R, Ranasinghe C, Medveczky CJ, Pamungkas J, et al. Prime-boost strategies in DNA vaccines. *Methods Mol Med.* 2006;127:171-97.
36. Chiang PK, Bujnicki JM, Su X, Lanar DE. Malaria: therapy, genes and vaccines. *Curr Mol Med.* 2006;6:309-26.
37. Hotez PJ, Ferris MT. The antipoverty vaccines. *Vaccine.* 2006;24:5787-99.
38. Srivastava IK, Liu MA. Gene vaccines. *Ann Intern Med.* 2003;138:550-9.
39. Liu MA. DNA vaccines: a review. *J Intern Med.* 2003;253:402-10.
40. Prymula R. Present view of conjugated pneumococcus vaccines. *Klin Mikrobiol Infekc Lek.* 2006;12:98-102.
41. Alonso JM, Taha MK. Meningococcal vaccines: present status and perspectives. *Therapie.* 2005;60:283-6.
42. Fraser CM, Rappouli R. Application of microbial genomic science to advanced therapeutics. *Ann Rev Med.* 2005;56:459-74.
43. Serruto D, Rappouli R. Post-genomic vaccine development. *FEBS Letters.* 2006;580:2985-92.
44. Khan AS, Mujer CV, Alefantis TG, Connolly JP, Mayr UB, Walcher P, et al. Proteomics and bioinformatics strategies to design countermeasures against infectious threat agents. *J Chem Inf Model.* 2006;46:111-5.
45. Scarselli M, Giuliani MM, Adu-Bobie J, Pizza M, Rappouli R. The impact of genomics on vaccine design. *TRENDS in Biotechnology.* 2005;23:84-91.
46. Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, et al. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science.* 1995;269:496-512.
47. Rappouli R. Reverse vaccinology, a genome-based approach to vaccines development. *Vaccine.* 2001;19:2688-91.
48. Edwards KM. Development, acceptance and use of immunology correlates of protection in monitoring the effectiveness of combination vaccines. *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 4:S274-7.
49. Michaeli D. Vaccines and monoclonal antibodies. *Semin Oncol.* 2005;32 Suppl 9:S82-6.
50. Naz RK, Gupta SK, Gupta JC, Vyas HK, Talwar AG. Recent advances in contraceptive vaccine development: a mini review. *Hum Reprod.* 2005;20:3271-83.
51. Emens LA. Roadmap to a better therapeutic tumor vaccine. *Int Rev Immunol.* 2006;25:415-43.
52. Cramer R, Rhyner C. Novel vaccines and adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:761-8.