

Tecnologías de producción de vacunas (II). Vacunas inactivadas

L. Salleras

Director General de Salud Pública. Departamento de Sanidad y Seguridad Social. Generalitat de Catalunya.

Introducción

Según su composición, las vacunas pueden clasificarse en: vivas, inactivadas y génicas¹⁻¹⁴. Las primeras consisten en microorganismos vivos atenuados por diferentes procedimientos²⁻¹⁰. Los agentes inmunizantes se replican en el huésped vacunado al que inmunizan sin causarle la enfermedad natural. Las inactivadas contienen microorganismos enteros inactivados o sus subunidades inmunógenas²⁻¹⁰. Actúan como antígenos inmunógenos no replicantes. En las vacunas génicas no se inyecta el microorganismo o sus fracciones inmunógenas sino el gen que codifica para la proteína inmunizante¹¹⁻¹⁴.

En un artículo publicado en el número anterior de esta revista, se han descrito las tecnologías de producción de vacunas vivas atenuadas¹⁵. En el presente artículo se describirán los métodos de obtención de las vacunas inactivadas. En el próximo número se abordarán los procedimientos utilizados para la producción de las vacunas génicas.

Ellis divide las tecnologías de producción de vacunas inactivadas en clásicas y modernas^{2,3}. Las tecnologías clásicas incluyen los procedimientos utilizados hasta muy recientemente para la obtención de las vacunas inactivadas enteras o de sus fracciones o subunidades inmunógenas naturales (inactivación por procedimientos físicos o químicos). Los nuevos métodos de producción de vacunas inactivadas utilizan la tecnología de ADN recombinante para la obtención de proteínas inmunizantes, expresan proteínas inmunizantes en plantas a las que se ha introducido el gen que las codifica, conjugan polisacáridos capsulares con proteínas para convertirlos en T-dependientes o producen péptidos inmunizantes por síntesis química (tabla 1).

Hay dos tipos de vacunas inactivadas, las de microorganismos enteros (vacunas de bacterias o virus enteros inactivados) y las de subunidades (fracciones antigénicas inmunizantes de bacterias o virus).

A diferencia de las vacunas vivas atenuadas, en estas vacunas no es posible la reversión a la patogenidad, lo que constituye una importante ventaja^{2,3}. Como contrapartida, al no replicarse el agente

infectante en el huésped, se requiere mayor masa antigénica e inyecciones repetidas (*booster*) para conseguir niveles inmunitarios protectores de larga duración.^{2,3,16} No obstante, en algunos casos (vacunas antihepatitis B y A) se ha conseguido una buena protección a medio plazo con la primovacuna, sin necesidad de revacunaciones².

Otra importante diferencia es que estas vacunas, por lo general, sólo dan lugar a una respuesta inmunitaria humoral (linfocitos B y anticuerpos), a diferencia de las vacunas vivas atenuadas que desencadenan, además, una respuesta inmunitaria celular de linfocitos Tc^{2,3,16}.

Vacunas de bacterias enteras inactivadas

Éstas fueron las primeras vacunas bacterianas comercializadas para su aplicación en humanos en la época pasteuriana de las vacunas, a finales del siglo XIX¹⁷. En aquel entonces se desconocía casi todo sobre los antígenos inmunizantes y su papel como estimuladores de la inmunidad protectora frente a la infección producida por bacterias.

De hecho, estas vacunas se elaboraron de forma empírica a partir de la observación hecha por Pasteur en 1879 de que los cultivos de bacilos de cólera de los pollos sometidos a calentamiento inmunizaban a las palomas, que quedaban protegidas frente a la subsecuente exposición a este bacilo¹⁷.

Era la primera vez que se demostraba que la adquisición de inmunidad protectora no dependía de la interacción de los microorganismos vivos con el huésped. Las primeras vacunas para uso en humanos así obtenidas, a finales del siglo XIX, fueron las del cólera, de la fiebre tifoidea y de la peste. Posteriormente, a principios del siglo XX, se consiguió la vacuna de células enteras inactivadas de la tos ferina¹⁷.

Las vacunas de bacterias enteras inactivadas se elaboran inactivando mediante el calor y agentes químicos, como el fenol, las bacterias enteras obtenidas de cultivos⁴. Como que el producto no

TABLA 1
Tecnologías de producción de vacunas inactivadas

Clásicas	Modernas
Inactivación por calor, formaldehído β -propiolactona o timerosal de bacterias o virus enteros	Conjugación de polisacáridos capsulares con proteínas
Tifoidea, cólera, polio tipo Salk, gripe inactivada	<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, neumocócica, 7-valente, meningocócica C
Inactivación por calor y formaldehído de antígenos secretados (toxinas)	Obtención de antígenos inmunizantes por recombinación genética
Difteria	Hepatitis B recombinante
Tétanos	Cólera (toxina B)
Toxina pertúsica	Toxina pertúsica
Obtención de fracciones inmunizantes virales o bacterianas naturales	Enfermedad de Lyme
AgHBs (hepatitis B plasmática)	Expresión de proteínas inmunizantes en plantas (vacunas comestibles)
Subunidades virales (gripe)	<i>E. coli</i> enterotoxigénico, hepatitis B, subunidad B de la toxina colérica
Polisacáridos capsulares (<i>Haemophilus influenzae</i> tipo b, meningococo A-C, neumococo)	Obtención de antígenos inmunizantes por síntesis química (vacunas peptídicas)
Fracciones antigénicas de bacterias (tos ferina)	Malaria

es sometido a ningún tipo de purificación, estas vacunas contienen todos los componentes bioquímicos de las bacterias, lo que hace que por lo general sean más reactógenas que las vacunas de subunidades.^{2,4}

Las vacunas enteras inactivadas de *Vibrio cholerae* y *S. typhi* confieren sólo moderados grados de protección inmunitaria (el 50-70% la anticolérica y el 58-88% la antitifoidea y para períodos de tiempo relativamente cortos)¹⁸. Es probable que, en parte, ello se deba a que estas bacterias ejercen su efecto patógeno en el intestino, mientras que estas vacunas son de administración parenteral¹⁸.

En cambio, la vacuna de células enteras de la tos ferina proporciona buenos grados de protección inmunitaria y ha demostrado ser efectiva en la reducción de la incidencia de la enfermedad en los países en los que se ha aplicado de forma sistemática a la población infantil en combinación con los toxoides tetánico y diftérico (vacuna DTP)^{18,19}. La reciente obtención de las vacunas acelulares, igualmente eficaces pero menos reactógenas, ha comportado la progresiva sustitución de las vacunas enteras por las nuevas vacunas más seguras²⁰.

Un hecho de reciente adquisición es que estas vacunas pueden ser bien toleradas por vía oral e incluso resultan más inmunógenas. En la década de los noventa se ha ensayado una vacuna de células enteras de *Vibrio cholerae* que, administrada por vía oral, junto con la subunidad B de la toxina colérica, ha demostrado ser inmunógena y eficaz, y de forma reciente ha sido comercializada²¹. También se ha ensayado una vacuna de células enteras inactivadas de administración oral frente a *Escherichia coli* enterotoxigénico²².

La eclosión de nuevas tecnologías de producción de vacunas que permiten la obtención de vacunas más purificadas y la creciente exigencia de seguridad por parte de las agencias responsables del registro de nuevas vacunas hacen poco probable que en el futuro se comercialicen nuevas vacunas bacterianas inactivadas obtenidas con las tecnologías clásicas².

Vacunas de virus enteros inactivados

La tecnología de preparación de estas vacunas se conoce desde hace varias décadas. Los virus vivos obtenidos de cerebro de corde-

ro (rabia), de cerebro de ratón (encefalitis japonesa), cultivados en huevo embrionado de pato (rabia) o de pollo (gripe), obtenidos de cultivos celulares (poliomielitis, rabia) u obtenidos mediante la lisis de las células infectadas y posterior purificación bioquímica de las partículas de virus (hepatitis A) son inactivados mediante agentes químicos como el formaldehído, la etilnamina y la β -propiolactona. Como adyuvante de algunas de estas vacunas se utilizan las sales de aluminio^{2,3,16}.

Estas vacunas inactivadas son, por lo general, más seguras y menos sensibles a la temperatura que las vacunas vivas atenuadas. Este último punto es fundamental para su aplicación en los países tropicales. Su principal inconveniente es que son más caras que las vacunas virales vivas atenuadas, ya que al no replicarse el virus en el huésped vacunado se requiere más masa antigénica y la administración de varias inyecciones para la inmunización primaria y dosis de refuerzo^{2,3,16}.

Los epítomos inmunizantes clave de la superficie de muchos virus pequeños que carecen de envoltura no suelen ser lineales sino conformacionales (secuencia discontinua de aminoácidos, consecuencia del plegamiento de cadenas de polipéptidos cercanos de moléculas simples o adyacentes). No parece posible reproducir esta compleja estructura de epítomos conformacionales mediante otras tecnologías como la de ADN recombinante, por lo que la inactivación de virus por medios químicos es probable que continúe siendo durante muchos años la tecnología de elección para la obtención de vacunas frente a este tipo de virus, por lo menos hasta que estén disponibles las nuevas vacunas de ADN².

Toxoides o anatoxinas

En algunas infecciones como el tétanos y la difteria, los síntomas no son causados por la acción directa del germen sino por una potente exotoxina secretada por la bacteria responsable de la enfermedad. Desde los inicios de la inmunología, a finales del siglo pasado, se conoce que los anticuerpos frente a dichas toxinas son efectivos en el tratamiento y prevención de estas infecciones^{23,24}.

Los toxoides o anatoxinas son vacunas obtenidas sometiendo la toxina purificada extraída de los cultivos a la acción del calor y

del formaldehído o glutaraldehído, lo que elimina su capacidad patogénica pero conservando la inmunizante. Estas vacunas son muy inmunógenas y han demostrado ser eficaces en la prevención del tétanos y de la difteria, desde los años veinte del siglo pasado¹⁷. La mayoría de vacunas acelulares de la tos ferina tienen también como componente la toxina pertusis tratada por procedimientos químicos²⁰. Este toxoide es uno de los componentes de la vacuna acelular de la tos ferina comercializado de forma reciente. Los otros son antígenos estructurales de la bacteria.

La detoxificación química de la toxina presenta algunos inconvenientes, entre ellos la posible alteración de los epítomos y la consiguiente reducción de la inmunogenicidad, y el potencial de reversión del toxoide a la forma biológica activa de la toxina, con la consiguiente vuelta a la patogenicidad²⁵.

Para evitar estos inconvenientes se ha utilizado la tecnología de ADN recombinante (rADN) para producir un toxoide estable. Recientemente el grupo de Rapuoli ha obtenido una vacuna frente a la toxina de *Bordetella pertussis* por este procedimiento²⁶.

Proteínas inmunizantes naturales de origen viral

La vacuna plasmática frente a la hepatitis B es el único ejemplo de una proteína natural obtenida de un tejido humano, el plasma, para ser usada como inmunógeno.

Las células hepáticas infectadas de forma crónica por el VHB eliminan el exceso de proteínas de la superficie del virus, el AgHBs, a la sangre. Estas proteínas, identificadas a principios de los años setenta, son unas partículas de 22 mμ de longitud que contienen los epítomos protectores. La vacuna plasmática frente a la hepatitis B se obtiene purificando el AgHBs obtenido de plasma humano e inactivándolo con hasta tres técnicas de inactivación según el fabricante, con objeto de destruir cualquier virus de la hepatitis B o de otro tipo presente en el plasma donante. Esta vacuna ha demostrado ser muy inmunógena y eficaz, y se ha usado ampliamente en todo el mundo para la prevención de la hepatitis²⁷.

En la actualidad, en los países desarrollados se ha sustituido por la vacuna obtenida por recombinación genética.

Fracciones virales inmunizantes

Un ejemplo de este tipo de vacunas son las vacunas de subunidades de virus de la gripe. Hay de dos tipos: fraccionada y purificada²⁸.

Las vacunas fraccionadas (*split vaccines*) se obtienen tratando los virus decantados de cultivos de embriones de pollo con disolventes orgánicos, básicamente el éter. Los fragmentos obtenidos contienen fracciones de las proteínas de la membrana del virus incluidas las inmunógenas (glucoproteína y neuroaminidasa)²⁸. Las vacunas purificadas (vacunas de subunidades, *subunit or purified surface antigen vaccines*) se obtienen tratando los virus con detergentes (dodecil sulfato), lo que permite obtener las glucoproteínas inmunizantes completamente purificadas²⁸.

Su inmunogenicidad y reactogenicidad son semejantes. Todos los autores están de acuerdo en que son menos reactógenas que las vacunas de virus enteros. Algunos estudios sugieren que son me-

nos inmunógenas que las de virus enteros inactivados, pero otros estudios no han encontrado diferencias en la inmunogenicidad²⁸.

Por ser menos reactógenas, están especialmente indicadas en niños, pero se usan también ampliamente en adultos.

Recientemente se han obtenido vacunas de subunidades de inmunogenicidad incrementada mediante la utilización de nuevos adyuvantes, el MF59, una emulsión de aceite en agua^{29,30} y los liposomas (virosomas)^{31,32}. Estas vacunas han demostrado ser bastante más inmunógenas que las vacunas clásicas, sin que ello comprometa su seguridad.

Fracciones bacterianas inmunizantes

En el bacilo pertusis se han identificado cuatro fracciones bacterianas (hemaglutinina filamentosa, pertactina y 2 fimbrias o aglutinógenos) y una exotoxina (toxina pertúsica) inmunizantes²⁰. Estas proteínas pueden extraerse de los cultivos y una vez purificadas se utilizan como proteínas inmunógenas en la vacuna acelular. Esta vacuna contiene de 2 a 5 componentes (según el laboratorio fabricante), incluida la toxina pertusis inactivada y ha resultado ser igual de inmunógena y protectora como la vacuna de células enteras, pero menos reactógena²⁰.

Vacunas de polisacáridos capsulares (*plain polysaccharide vaccines*)

En muchas de las bacterias encapsuladas, los anticuerpos frente a los polisacáridos de la cápsula son protectores frente a la infección bacteriana. Estos polisacáridos de la cápsula se han utilizado como antígenos inmunizantes en las vacunas producidas para la protección frente a la enfermedad invasiva causada por estas bacterias encapsuladas (*Haemophilus influenzae* tipo b, *S. pneumoniae* y *N. meningitidis*). Estas preparaciones vacunales son inmunógenas en los niños mayores de 2 años y los adultos, proporcionando protección frente al serogrupo o serotipo causante de la infección. La protección conferida es de corta duración debido a que, por tratarse de antígenos T independientes, no despiertan memoria inmunológica³³⁻³⁵.

La vacuna monovalente frente al *Haemophilus influenzae* tipo b ha caído en desuso desde que se dispuso de la vacuna conjugada. Las vacunas neumocócica 23 valente y la meningocócica A + C en cambio tienen todavía sus indicaciones a pesar de que ya se dispone de la vacuna conjugada de 7 serotipos de neumococo y de la meningocócica C conjugada.

Vacunas de polisacáridos capsulares conjugados con proteínas

Los antígenos inmunizantes son de dos tipos: los T dependientes, que necesitan el estímulo de los linfocitos Th₂ para iniciar la producción de anticuerpos y los T independientes que no lo necesitan^{33,34}.

La mayoría de los antígenos proteicos pertenecen al primer grupo. Son inmunógenos en los niños pequeños, la respuesta de

anticuerpos es principalmente del tipo IgG y dan lugar a memoria inmunológica³⁴.

En cambio, los polisacáridos capsulares (meningococo, neumococo, *H. influenzae* tipo b) son antígenos T independientes y por ello son muy poco inmunógenos en los niños menores de 2 años, la respuesta de anticuerpos es principalmente del tipo IgM y no originan memoria inmunológica³⁴. Para corregir estos defectos hay que conjugarlos con una proteína transportadora (*carrier*), como el toxoide diftérico o el tetánico, para convertirlos en antígenos T dependientes¹⁰. Estas vacunas son inmunógenas en los niños menores de 2 años, y proporcionan memoria inmunológica por lo que la protección conferida es de por vida y la respuesta de anticuerpos es principalmente del tipo IgG.

En la actualidad están comercializadas vacunas de polisacáridos capsulares conjugadas con proteínas frente al *Hemophilus influenzae* tipo b, meningococo C y neumococo de 7 serotipos que han demostrado ser inmunógenas, seguras y eficaces en la prevención de la infección producida por estos gérmenes³⁶⁻⁴¹. Muy recientemente, se ha conseguido desarrollar la cuarta vacuna de polisacáridos conjugados con proteínas, la del polisacárido Vi de *Salmonella thyphi* conjugada con la exotoxina A no tóxica de *Pseudomonas aeruginosa*^{42,43}.

Vacunas obtenidas por síntesis química (vacunas sintéticas, vacunas peptídicas)

Muchos de los epítomos de linfocitos B son conformacionales, formados por la yuxtaposición en tres dimensiones espaciales de residuos de aminoácidos de diferentes porciones del polipéptido. Estos epítomos requieren del polipéptido completo para que sean inmunógenos².

En contraste, otros epítomos peptídicos son de naturaleza linear, formados por entre 6 y 20 residuos de aminoácidos en el polipeptido. Algunos de estos epítomos son inmunógenos débiles cuando se presentan en el contexto del polipeptido, por lo que las vacunas preparadas con todo o parte del polipéptido son poco inmunógenas. La proteína del circunsporozoito de la malaria (secuencias repetidas de 4 aminoácidos)⁴⁴ y la proteína gp120 (entre los residuos de aminoácidos 301 a 336)⁴⁵ del VIH son de este tipo. Estos polipéptidos contienen epítomos que son reconocidos por los anticuerpos que neutralizan los respectivos patógenos, pero el polipéptido completo desencadena una respuesta inmunitaria muy débil.

Para aumentar la inmunogenicidad de estos epítomos se han propuesto tres estrategias²: a) Fusiónar los epitopos con proteínas transportadoras (p. ej. los antígenos de superficie y del *core* del virus de la hepatitis B), con lo que se constituye una partícula que mejora la presentación del péptido a las células del sistema inmunitario^{46,47}; b) conjugación por unión covalente del péptido con una proteína transportadora. Las más utilizadas han sido las proteínas bacterianas humanas. Una vacuna sintética de epítomos del circunsporozoito de la malaria conjugada con el toxoide tetánico ha sido ensayada en humanos⁴⁸; y c) obtención de péptidos complejos. Se sintetizan multimeros de las secuencias de péptidos por unión conjunta en *arrays* repetidos. Esta estrategia se ha aplicado al circunsporozoito de la malaria⁴⁹ y a los epítomos del péptido gp120 del virus del sida⁵⁰.

Estas tres estrategias incrementan la inmunogenicidad de los epítomos lineales y dan lugar a incrementos importantes de la respuesta inmunitaria frente a los productos vacunales así preparados, en comparación con la desencadenada cuando los epítomos son presentados en el contexto de su polipéptido natural, pero no han conducido hasta el momento a la consecución de vacunas de interés clínico².

Aunque las vacunas sintéticas constituyen una idea prometedora en el campo de la vacunología, hasta el momento no se ha comercializado ninguna vacuna de este tipo para uso en humanos.

La que ha llegado más lejos es la vacuna sintética contra la malaria desarrollada por Patarroyo, la SPf66, una proteína sintética compuesta de secuencias de tres proteínas del esquizoito y una del merozoito de *Plasmodium malariae*. En 1988 este autor publicó, junto con sus colaboradores, los resultados de un estudio que indicaba que una mezcla de tres polipéptidos de la proteína del plasmodio aislada en la fase de esquizoito y una de la de merozoito de la infección palúdica protegían parcialmente a los monos infectados de la enfermedad⁵¹. Animados por estos resultados sintetizaron por métodos químicos la citada proteína SPf66.

En un ensayo de campo efectuado en voluntarios colombianos, esta vacuna evidenció una protección del 39%. Este ensayo no se realizó de acuerdo con los postulados vigentes actualmente para los ensayos clínicos controlados (asignación controlada y aleatorizada, doble ciego) por lo que sus resultados no fueron considerados válidos⁵². Otros ensayos de campo efectuados en Colombia y Venezuela ofrecieron resultados semejantes^{53,54}.

Un nuevo ensayo controlado efectuado en Tanzania en 1994, en un área de intensa transmisión de la infección, puso de manifiesto una eficacia protectora del 31%, pero en el límite de la significación estadística, por lo que fue considerado un resultado *borderline*⁵⁵. En este estudio el diseño fue correcto, pero los resultados no permitieron extraer conclusiones definitivas sobre el valor protector de la vacuna frente a los ataques clínicos de la malaria.

Para salir del *impasse*, la oficina para el desarrollo de vacunas de la OMS en Ginebra, promovió una serie de estudios de eficacia protectora de esta vacuna a realizar por investigadores independientes en Gambia y Tailandia. Del resultado de estos estudios iba a depender la aceptación por parte de la OMS de la patente de la vacuna que Patarroyo había cedido a la OMS. Lamentablemente los resultados de estos estudios fueron negativos, por lo que en su actual formulación, la eficacia protectora de la vacuna SPf66 frente a los episodios clínicos de malaria parece descartada⁵⁶⁻⁵⁸. Patarroyo ha desarrollado recientemente nuevas formulaciones de su vacuna con las que próximamente iniciará varios estudios de inmunogenicidad y eficacia protectora⁵⁹.

Proteínas inmunizantes obtenidas por recombinación genética

Mediante las modernas tecnologías de ADN recombinante se pueden obtener antígenos inmunizantes por recombinación genética. Para ello se insertan plásmidos que contienen los genes que codifican para la proteína inmunizante en levaduras o células de mamíferos.

La primera vacuna obtenida con esta tecnología fue la antihepatitis B recombinante. Para ello se insertó el gen que codifica para

TABLA 2
Vacunas a base de proteínas inmunizantes expresadas en plantas transgénicas de aplicación en humanos

Agente patógeno frente al que protege la vacuna	Proteína inmunizante expresada en la planta	Sistema de expresión
<i>E. coli</i> enterotoxigénico	Subunidad B de la toxina termolábil (LTB)	Tabaco
		Patatas
		Maíz
<i>Vibrio cholerae</i>	Subunidad B de la toxina colérica	Patatas
Virus de la hepatitis B	Proteína de superficie de la cubierta del virus	Tabaco
		Patatas
		Lechuga
Virus de la rabia	Genoproteína	Tomate
Citomegalovirus	Glicoproteína B	Tabaco

el AgHBs en el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*⁶⁰. Si esta levadura se fermenta en grandes recipientes, se pueden producir grandes cantidades del polipéptido AgHBs que se asemeja estrechamente a la partícula natural de 22 µm que se encuentra en el suero de las personas infectadas y que, una vez inactivado, es la base de la vacuna plasmática. El epítipo «a» responsable de la respuesta inmunitaria protectora frente a la hepatitis B se encuentra en la superficie de la partícula artificial AgHBs igual que en el antígeno natural⁶⁰.

De forma reciente, se ha obtenido por el mismo procedimiento una vacuna frente a la enfermedad de Lyme, que ha sido comercializada en los EE.UU.⁶¹⁻⁶⁴.

Otra vacuna de bacterias inactivadas obtenidas en parte por este procedimiento es la vacuna anticolérica inactivada oral de bacterias enteras más la subunidad B (WC/rBS) de administración oral. Esta vacuna contiene bacterias completas inactivadas más la subunidad B de la toxina colérica (porción inmunógena y no tóxica de la toxina colérica) producida a partir de una cepa de *V. cholerae* obtenida por ingeniería genética que hiperproduce la subunidad B y no produce holotoxina (subunidad A tóxica)⁶⁵. Esta vacuna ha demostrado buenos grados de protección en ensayos de campo efectuados en Bangladesh^{21,66} y en turistas finlandeses en viaje a Marruecos⁶⁷.

Proteínas inmunizantes expresadas en plantas (vacunas edibles o comestibles)

En este caso el gen que codifica para la proteína inmunizante se introduce en plantas que luego expresarán la proteína^{8,9,68}.

Existen dos formas de incorporar el gen a las plantas para que expresen proteínas heterólogas^{8,9,68}. En la primera, el gen es integrado de forma estable en el genoma de la planta (plantas transgénicas) en el que queda establecido de forma permanente y es heredado por la siguiente generación de plantas. En la segunda, el gen se introduce en la planta mediante uno de los virus que infectan a las plantas y permanece de forma transitoria en el citoplasma de las células, en el genoma del virus pero no en el de la planta. La expresión de la proteína inmunizante es transitoria mientras dure la infección y no es heredada por la generación siguiente. El primer sistema (plantas transgénicas) es aplicable sólo a un número limitado de especies de plantas y el coste del producto final es elevado⁹. El

segundo (genes vehiculados por virus que infectan a las plantas) es aplicable a todas las plantas que son susceptibles a los virus vectores y el coste es relativamente bajo⁹. En ambos casos las proteínas inmunizantes son expresadas en la planta, que al ser ingerida como alimento introduce el antígeno en el tubo digestivo desencadenando una respuesta inmunizante específica en la mucosa intestinal (vacunas edibles o comestibles).

La mayoría de las proteínas inmunizantes sintetizadas en plantas hasta el momento mediante esta tecnología lo han sido en plantas transgénicas.

Varios estudios han demostrado que las proteínas inmunizantes pueden ser sintetizadas en grandes cantidades en su conformación auténtica en plantas transgénicas⁶⁹⁻⁷³. Administradas por vía oral en forma de alimentos, estos antígenos producidos en plantas han sido capaces de desencadenar una respuesta inmunitaria aceptable⁷⁴⁻⁷⁶. En algunos casos se ha probado, además, su efecto protector frente a la exposición experimental al agente patógeno en animales de experimentación^{77,78}. Por último, para ciertos antígenos se han iniciado ya los ensayos clínicos de inmunogenicidad y seguridad en humanos^{76,78-80}.

En la tabla 2 se relacionan las principales proteínas inmunizantes obtenidas en plantas transgénicas con el correspondiente sistema de expresión (plantas) y agentes infecciosos frente a los que protegen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Salleras L. Pasado, presente y futuro de las vacunas. *Vacunas* 2001;2:101-9
2. Ellis R. New technologies for making vaccines. In: Plotkin AS, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 881-901.
3. Ellis R. Technologies for the design, discovery, formulation and administration of vaccines. *Vaccine* 2001;19:2681-7.
4. Ada GL. The traditional vaccines: an overview. In: Levine MM, Woodrow GL, Kaper JB, Cobon GS, editors. *New generation vaccines*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; p. 13-53.
5. Rabinovich NR, Mc Innes P, Klein DL, Hall BF. Vaccine technologies: view to the future. *Science* 1994;265:1401-4.
6. Liu MA. Vaccine developments. *Nat Med (vaccine supplement)* 1998;4:S15-9.
7. Woodrow GC. An overview of biotechnology as applied to vaccine development. In: Levine MM, Woodrow GL, Kaper JB, Cobon GS, editors. *New generation vaccines*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc. 1997; p. 25-34.
8. Tacket CO, Mason HS. A review of oral vaccination with transgenic vegetables. *Microbes Infect* 1999;1:777-83.
9. Koprowski H, Yusibov V. The green revolution: plants as heterologous expression vectors. *Vaccine* 2001;19:2735-41.

10. Buttery JP, Moxon ER. Designing meningitis vaccines. *JR College Physicians* 2000;34:163-7.
11. Paoletti E. Applications of pox virus vectors to vaccination: an update. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:11349-53.
12. Immler JH. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* 1995; 13:1143-51.
13. Donnelly JJ, Ulmer AB, Liu MA. DNA vaccines. *Life Sci* 1997;60:163-72.
14. Donnelly JJ, Ulmer AB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:617-48.
15. Salleras L. Tecnologías de producción de vacunas (I): Vacunas vivas atenuadas. *Vacunas* 2002;3:29-33.
16. Ellis RW. New technologies for making vaccines. *Vaccine* 1999;17:1596-604.
17. Plotkin SL, Plotkin SA. A short history of vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 1-12.
18. Pace JL, Rossi HA, Esposito VM, Frey SM, Tucker KD, Walker RI. Inactivated whole-cell bacterial vaccines: current status and novel strategies. *Vaccine* 1998;16:1563-74.
19. Cherry JD, Brunell PA, Golden GS, Karzon DT. Report of the task force on pertussis and pertussis immunization, 1988. *Pediatrics* 1988;81:939-45.
20. Edwards KM, Decker MD, Mortimer EA Jr. Pertussis vaccine. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 293-344.
21. Clements JD, Sack DA, Harris JR, Chakraborty J, Khan MR, Stanton BF et al. Field trial of oral cholera vaccines in Bangladesh; results from three years follow-up. *Lancet* 1990;355:270-3.
22. Scennerholm AM, Holmgren I, Sack DA. Development of oral vaccines against enterotoxigenic *Escherichia Coli* diarrhoea. *Vaccine* 1996;14:735-46.
23. Pappenheimer AM Jr. Diphtheria. In: Germanier R, editor. *Bacterial vaccines*. Orlando: Academic Press, 1984; p. 1-32.
24. Bizzini B. Tetanus. In: Germanier R, editor. *Bacterial vaccines*. Orlando: Academic Press, 1984; p. 33-64.
25. Rapuoli R. Rational design of vaccines. *Nat Med* 1997;3:374-6.
26. Del Giudice G, Rappuoli R. Genetically derived toxoids for use as vaccines and adjuvants. *Vaccine* 1999;17:S44-52.
27. Sitrin RD, Wampler DE, Ellis RW. Survey of licensed hepatitis B vaccines and their production processes. In: Ellis RW, editor. *Hepatitis B vaccines in clinical practice*. New York: Marcel Dekker, 1993; p. 83-101.
28. Kilbourne ED, Arden NH. Inactivated influenza vaccines. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 531-52.
29. Dooley M, Goa KL. Adjuvanted influenza vaccines. *Biodrugs* 2000;14:61-9.
30. Podda A. The adjuvanted influenza vaccines with novel adjuvants: experience with the MF59-adjuvanted vaccine. *Vaccine* 2001;19:2673-80.
31. Gluck R. Adjuvant activity of immunopotentiating reconstituted influenza viro-somes (IRIVs). *Vaccine* 1999;17:1782-7.
32. Holm KJ, Goa KL. Liposomal influenza vaccine. *Biodrugs* 1999;11:137-44.
33. Zubler RH. Antigens T-dependent and T-independent. In: Roitt IM, Delves JP, editors. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic Press, 1992; p. 130-8.
34. Lesinski GB, Westerink MAJ. Novel vaccine strategies to T-independent antigens. *J Microb Methods* 2001;47:135-49.
35. Fedson DS, Musher DM, Eskola J. Pneumococcal vaccination. In: Plotkin SA, Orenstein WA, editors. *Vaccines*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1999; p. 553-608.
36. Adams WG, Deaver KA, Cochi SL, Plikaytis BD, Zell ER, Broome CV, et al. Decline of childhood haemophilus influenzae type b (Hib) disease in the Hib vaccine era. *JAMA* 1993;269:221-6.
37. Salleras L, Domínguez A, Prats G. Control of serogroup C meningococcal disease by mass vaccination in Catalonia (Spain). *Vaccine* 1999;17:556-60.
38. Salleras L, Domínguez A, Prats G, Parron I, Muñoz P. Dramatic decline of serogroup C meningococcal disease incidence in Catalonia (Spain) 24 months after mass vaccination programme of children and young people. *J Epidemiol Community Health* 2001;55:283-7.
39. Ramsay MB, Andrews N, Kaczmarski EB, Miller E. Efficacy of meningococcal serogroup C conjugate vaccine in teenagers and toddlers in England. *Lancet* 2001;357:195-6.
40. Black S, Shinefield M, Fireman B, Lewis B, Ray P, Hansen JR, et al. Efficacy, safety and immunogenicity of heptavalent pneumococcal conjugate vaccine in children. *Pediatr Infect Dis J* 2000;19:187-95.
41. Eskola J, Kilpi T, Palmu A, Jokinen J, Haapakoski J, Herva E, et al. Efficacy of a pneumococcal conjugate vaccine against acute otitis media. *N Engl J Med* 2001;344:403-9.
42. Lin FYC, Ho VA, Khiem HB, Trach DD, Bay PV, Thanh TC et al. The efficacy of a *Salmonella* Typhi Vi conjugate vaccine in two-to-five-year-old children. *N Engl J Med* 2001;344:1263-9.
43. Guerrant RL, Kosek M. Polysaccharide conjugate typhoid vaccine. *N Engl J Med* 2001;344:1322-3.
44. Zavala F, Cochrane AH, Nardín EH, Nussenzweig RS, Nussenzweig V. Circumsporozoite proteins of malaria parasites contain a single immunodominant region with two or more identical epitopes. *J Exp Med* 1983; 57:1947-57.
45. Javaherian K, Langlois AJ, McDaniel C, Ross KL, Eckler LI, Jellis CL, et al. Principal neutralizing domain of the human immunodeficiency virus-type 1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:6768-72.
46. Vreden SG, Verhave JP, Oettinger T, Sauerwein RW, Meuwissen JH. Phase I clinical trial of a recombinant malaria vaccine consisting of the circumsporozoite repeat region of *Plasmodium falciparum* coupled to hepatitis B surface antigen. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45:533-8.
47. Schodel F, Peterson D, Hughes J, Wirtz R, Milich D. Hybrid hepatitis B virus core antigen as a vaccine carrier moiety: I. Presentation of foreign epitopes. *J Biotechnol* 1996;44:91-6.
48. Herrington DA, Clyde DF, Losonsky G, Cortesia M, Murphy JR, Davis J, et al. Safety and immunogenicity in man of a synthetic peptide in malaria vaccine against *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Nature* 1987;328:257-9.
49. Wang CY, Looney DJ, Li ML, Walfield AM, Ye J, Hosein B, et al. Long-term high-titer neutralizing activity induced by octomeric synthetic HIV-1 antigen. *Science* 1991;254:285-8.
50. Tam JP, Clavijo P, Lu YA, Nussenzweig V, Nussenzweig R, Zavala F. Incorporation of T and B epitopes of the circumsporozoite protein in a chemically defined synthetic vaccine against malaria. *J Exp Med* 1990;171:299-306.
51. Patarroyo ME, Amador R, Clavijo P, Moreno A, Guzmán F, Romero P, et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 1988;332:158-61.
52. Amador R, Moreno A, Valero V, Murillo L, Mora AL, Rojas M, et al. The first field trials of the chemical vaccine SPf66: immunogenicity and protectivity. *Vaccine* 1992;10:179-84.
53. Valero MV, Amador R, Aponte JJ, Narváez A, Galindo C, Silva J et al. Evaluation of SPf66 malaria vaccine during a 22 months follow-up field trial in the Pacific coast of Colombia. *Vaccine* 1996;14:1466-70.
54. Noya O, Gabaldón Berti J, Alarcón de Noya B, Borges R, Noraida Z, Urbáez JD, et al. A population-based clinical trial with the SPf66 synthetic *Plasmodium falciparum* malaria vaccine in Venezuela. *J Infect Dis* 1994;170:396-402.
55. Alonso PL, Smith T, Armstrong Schellenberg JRM, Masanja H, Mwangusye S, Urassa H, et al. Randomised trial of efficacy of SPf66 vaccine against *Plasmodium falciparum* malaria in children in southern Tanzania. *Lancet* 1994;344:1175-81.
56. D'Alessandro U, Leach A, Drakeley J, Bennett S, Olaleye BO, Fegan GW. Efficacy trial of malaria vaccine SPf66 in Gambia infants. *Lancet* 1995;346:462-7.
57. Nosten F, Luxemburger C, Kyle DE, Ripley Bullon W, Wittes J, Wah EH, et al. Randomised double-blind placebo-controlled trial of SPf66 malaria vaccine in children in northwestern Thailand. *Lancet* 1996;348:701-7.
58. Acosta CJ, Galindo CM, Schellenberg D, Aponte JJ, Kahigwa E, Urassa H, et al. Evaluation of the SPf66 vaccine for malarial control when delivered through the EPI schemes in Tanzania. *Tropical Medicine and International Health* 1999;4: 368-76.
59. Rosas JE, Pedraz JL, Hernández RM, Gascón AR, Igarúa M, Guzmán R, et al. Remarkably high antibody levels and protection against *P. falciparum* malaria in Aotus monkeys after a single immunisation of SPf66 encapsulated in PLGA microspheres. *Vaccine* 2002;20:1707-10.
60. Stephens J. Development and production aspects of a recombinant yeast-derived hepatitis B vaccine. *Vaccine* 1990;8(Suppl):S69-73.
61. Sikand VK, Halsey N, Krause PJ, Sood DK, Geller R, Vawhocke CC, et al. Safety and immunogenicity of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A vaccine against Lyme disease in healthy children and adolescents: a randomised clinical trial. *Pediatrics* 2001;108:123-8.
62. Stere A, Sikand UK, Meurice F, Parenti DL, Figir E, Shoen RT, et al. Vaccination against Lyme disease with recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface lepoprotein A with adjuvant. *N Engl J Med* 1998;339:209-15.
63. Sigal LH, Zahradnik JM, Lavin P, Patella SJ, Bryant G, Haseley R, et al. A vaccine consisting of recombinant *Borrelia burgdorferi* outer-surface protein A to prevent Lyme Disease. *N Engl J Med* 1998;339:216-22.
64. Thanasi WT, Shoen RT. The Lyme disease vaccine: conception, development and implementation. *Ann Intern Med* 2000;132:661-8.
65. Holmgren J, Svennerholm A-M, Sack D, Clemens J. New and improved vaccines against cholera: the oral B subunit/inactivated whole cell vaccine. In: Woodrow GC, Levine MM, editors. *New Generation Vaccines*. New York: Marcel Dekker, Inc. 1990; p. 289-304.

66. Sack DA, Clemens JD, Huda JR, Khan MR, Chakraborty J, Yunus M et al. Antibody responses after immunization with killed oral cholera vaccines during the 1985 vaccine field trial in Bangladesh. *J Infect Dis* 1991;164:407-11.
67. Peltola H, Siitonen A, Kryönseppä H, Simula I, Mattila L, Oksanen P, et al. Prevention of travellers' diarrhoea by oral B-subunit/whole-cell cholera vaccine. *Lancet* 1991;338:1285-8.
68. Giddings G, Allison G, Books D, Carter A. Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat Biotechnol* 2000;18:1151-5.
69. Mason HS, Lam DM, Arntzen CJ. Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:11745-9.
70. Richter LJ, Thanavala Y, Arntzen CJ, Mason HS. Production of hepatitis B surface antigen in transgenic plants for oral immunization. *Nat Biotechnol* 2000; 18:1167-71.
71. Streatfield SJ, Yilka JM, Hood EE, Turner DD, Bailey MR, Mayor JM, et al. Plant-based vaccines: unique advantages. *Vaccine* 2001;19:2743-8.
72. Arakawa T, Chong DKX, Merritt JL, Landridge WHR. Expression of cholera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res* 1997;6:403-13.
73. Gomez N, Carrillo C, Salinas J, Parra F, Borca MV, Escibano JM. Expression of immunogenic glycoprotein S polypeptides from transmissible gastroenteritis coronavirus in transgenic plants. *Virology* 1998;249:352-8.
74. Haq TA, Mason HS, Clements JD, Arntzen CJ. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* 1995;268:714-6.
75. Mason HS, Ball JM, Shi JJ, Jiang X, Estes MK, Arntzen CJ. Expression of Norwalk virus capsid protein in transgenic tobacco and potato and its oral immunogenicity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5335-40.
76. Arakawa T, Chong DKX, Landridge WHR. Efficacy of a food plant-based oral cholerae toxin B subunit vaccine. *Nature Biotechnology* 1998;16:292-7.
77. Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic LT-B gene. *Vaccine* 1998;16:1336-43.
78. Yu J, Landridge HR. A plant-based multicomponent vaccine protects mice from enteric diseases. *Nature Biotechnology* 2001;19:548-52.
79. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Clements JD, Levine MM, Arntzen CJ. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat Med* 1998;4:607-9.
80. Tacket CO, Mason HS, Losonsky G, Estes MK, Levine MM, Arntzen CJ. Human immune responses to a novel Norwalk virus vaccine delivered in transgenic potatoes. *J Infect Dis* 2000;182:302-5.