

## MESA REDONDA: VACUNACIONES

### Técnicas de recombinación genética en la preparación de vacunas\*

R. LARDINOIS

#### INTRODUCCIÓN

Se ha iniciado una era tecnológica revolucionaria en el desarrollo y producción de fármacos y en particular de vacunas. Dichas innovaciones van a permitir no sólo mejorar las vacunas existentes, haciéndolas más eficaces, seguras, estables y baratas, sino también preparar vacunas nuevas para la prevención de enfermedades que no conseguimos controlar: el candidato más evidente para este tipo de vacuna, el SIDA, está en la mente de todos. El motor más importante que originó dicha transformación lo constituyen los adelantos importantes de la biotecnología, las técnicas de fusión celular y de recombinación del DNA.

#### CLONAJE

Dado que el tema de la presente comunicación se refiere a la recombinación genética, parece conveniente definir de entrada lo que llamamos clonaje. El procedimiento no es nuevo: El microbiólogo clínico está haciendo de experto en clonaje, cuando aísla un patógeno a partir de una muestra de heces que contiene numerosas cepas bacterianas. También lo hace el microbiólogo básico, al extraer entre

una población mixta bacteriana el mutante que posee o deja de poseer una propiedad determinada. Igualmente cualquier estudiante en medicina se dedica a clonar, cuando sobre una placa de agar que contiene muchas colonias separa una de ellas y obtiene su multiplicación en otro medio de cultivo.

De lo expuesto se deducen las dos características fundamentales del clonaje:

- a) La separación de una unidad biológica individual a partir de una población compuesta por unidades similares aunque diferentes.
- b) La propagación o multiplicación ulterior de la unidad básica aislada.

Los ejemplos anteriores se referían al clonaje de células. En adelante, para la producción de antígenos o vacunas, las unidades a clonar consistirán en pequeñas piezas del genoma (DNA) que vamos a introducir en células huéspedes en donde darán paso a la síntesis de la cadena polipeptídica correspondiente (antígeno).

#### RECOMBINACIÓN GENÉTICA Y PRODUCCIÓN DE VACUNAS

Cuatro elementos son imprescindibles para llevar a cabo la producción de antígenos por recombinación genética:

*I.T.E.M.-PHARMA, Alberto Alcocer, 17, 1.º A, 28036 Madrid.*

\* *IV Reunión de las Sociedades de Pediatría de Portugal, Galicia, Asturias, Cantabria, Castilla y León. Salamanca 10-11 noviembre, 1989.*

1.º El DNA portador de la secuencia que codifica la cadena de ácidos amínicos propia del antígeno, que deseamos conseguir.

2.º Las endonucleasas que se dedican unas a cortar y otras a unir fragmentos de DNA en sitios caracterizados por una secuencia corta bien determinada de nucleótidos.

3. Los vectores (plasmidos, fagos, cosmidos) o unidades de DNA capaces de penetrar en varios medios celulares y de replicarse de manera autónoma al interior de dichos huéspedes.

Además, se procura transformarlos en vectores de expresión, al injertarles unas secuencias de DNA extraño, que son las señales necesarias para que la célula huésped inicie y lleve a cabo la transcripción del gen clonado y su traducción en cadena polipeptídica.

4.º Las células huéspedes (bacterias, levaduras, células de mamíferos), que permiten la replicación de los vectores así como la síntesis de los polipéptidos (antígenos).

El guión de la producción de antígenos por recombinación genética incluye las etapas siguientes:

1) Partimos del DNA que contiene el gen a explorar, extraído de un gran número de células idénticas (por ejemplo, el DNA del VHB con el gen del HBsAg).

2) Mediante una enzima de restricción obtenemos in vitro numerosos fragmentos del DNA.

3) Algunos de estos fragmentos son portadores del gen deseado.

4) Por otro lado, sometemos a la misma enzima los vectores elegidos.

5) Ahora mezclamos fragmentos de vectores, fragmentos del genoma y una enzima DNA ligasa, con lo que se forman

vectores híbridos: unos pocos han incorporado al gen deseado y la mayoría, otras secuencias del genoma bacteriano ininteresantes.

6) Dado que los vectores híbridos se multiplican solamente en el medio intracelular, los ponemos en contacto con un cultivo de bacterias (*E. coli*).

7) Las bacterias infectadas se traspasan a placas de cultivo, de suerte que cada bacteria con sus vectores extraños dé lugar a una colonia.

8) Entre todas las colonias, ¿dónde pescar la colonia cuyas bacterias albergan el gen buscado?

Para ello, respetando las colocaciones respectivas en la placa, se transfiere una muestra de cada colonia a un disco de papel de filtro y se rompen las células de tal manera que el DNA queda expuesto.

9) Se añade el material de detección, una sonda radioactiva, hecha de una secuencia de nucleótidos complementaria del DNA a identificar: sólo el DNA buscado se hibrida con la sonda radioactiva.

10) Se elimina el material sonda no apareado.

11) Al cubrir el papel filtro con una emulsión, la muestra radioactiva produce una mancha en ésta: ya está identificada la colonia que contiene el clon a utilizar.

12) A continuación, a partir de la colonia seleccionada y mediante un cultivo adecuado, conseguiremos multiplicar nuestra reserva de vectores portadores del gen deseado.

13) De nuevo, por medio de enzimas de restricción y ligasas, transferimos el gen desde los vectores iniciales a otros vectores de expresión, provistos de todas las señales necesarias para la síntesis de proteínas.

14) Finalmente, se infecta un cultivo de células huéspedes (bacterias, levadu-

ras...) con los vectores de expresión portadores del gen clonado. Gracias a la maquinaria celular, se llevan a cabo la expresión y síntesis del material polipeptídico.

15) Si la célula huésped excreta el antígeno, su extracción y purificación se hará a partir del medio exterior; en el caso contrario, tendremos que romper las células y realizar la purificación del antígeno a partir del medio celular (operación más complicada).

#### DE NUEVO, EL VIRUS DE LA VACCINIA

El sistema descrito hasta ahora se refiere a la producción de polipéptidos/antígenos en células huéspedes lo bastante tolerantes como para permitir que, en su propio entorno y fuera de su propio genoma, un intruso, el vector de expresión, portador de un gen clonado, dirija la síntesis de proteínas extrañas.

Otro sistema de producción utiliza algunos microorganismos huéspedes (virus de la vaccinia), en los que la clonación de material genético extraño se realiza por recombinación dentro de su propio genoma. La operación empieza, preparando los vectores de expresión (por ejemplo, plásmidos) constituidos de:

- La secuencia de nucleótidos del propio vector.
- El gen clonado, del que se espera la respuesta y expresión.
- Unas secuencias de nucleótidos con las señales de transcripción y traducción específicas del microorganismo seleccionado.
- Unas secuencias de nucleótidos procedentes del virus de la vaccinia que permiten la hibridación entre DNA del vector y DNA del virus de la vaccinia.

A continuación juntamos vectores de expresión, virus de la vaccinia, y unas células huéspedes que quedarán infectadas por los vectores y microorganismos.

Durante la multiplicación viral al interior del huésped se llevan a cabo algunos casos de recombinación homóloga entre el virus y el vector, de tal suerte que algunos virus de la vaccinia incorporen el gen estudiado.

Una vez aislados dichos virus híbridos de vaccinia, disponemos de una vacuna atenuada, capaz de inducir la inmunidad frente a la viruela y frente al determinante antigénico clonado, sin que sea necesario extraer los polipéptidos y envasarlos como inmunógenos. Se han obtenido virus recombinantes de la vaccinia portadores a la vez de varios clones correspondientes al HBsAg del VHB, glicoproteína D del virus herpes simplex, glicoproteína del virus de la rabia y hemaglutinina del virus de la gripe.

#### LOGROS

Las técnicas de recombinación genética han permitido la fabricación de vacunas (HA, HB, polio, rabia, influenza, rotavirus) y de otras proteínas (inmunoglobulinas, activador del plasminógeno, insulina, hormona del crecimiento, somatostatina (inhibidora de la hormona de crecimiento), interferón...

Acabamos de resaltar la posibilidad de clonar varios genes dentro de virus recombinantes que se inoculan al animal y algún día al hombre. Dicha técnica permite saltarse los pasos de aislamiento y purificación *in vitro* de los antígenos. El virus recombinado, una vez inoculado, libera las proteínas específicas en el organismo del huésped vacunado y despierta una respuesta inmune polivalente.

## INTERÉS DE LAS VACUNAS FABRICADAS POR INGENIERÍA GENÉTICA

Las principales ventajas derivadas de la ingeniería genética consisten en:

- 1) Un suministro imitado del antígeno (interesante cuando un virus no se cultiva de manera satisfactoria, como el VHB).
- 2) Una absoluta homogeneidad y reproducción del preparado.
- 3) Una mayor pureza del preparado, ya que se procura clonar solamente los territorios del gen que codifican los determinantes antigénicos importantes del patógeno.
- 4) Una mayor tolerancia, al ser excluido de la producción el material no genético del patógeno. Sin embargo no se puede descartar otra contaminación procedente del material celular del huésped elegido.
- 5) Una menor peligrosidad para el personal dedicado a la producción de las vacunas, ya que el patógeno no interviene en el proceso.
- 6) Unos costes más bajos.

## CONCLUSIÓN

A la hora de sacar la moraleja de esta historia, destacaremos que no se ven lími-

tes teóricos a nuestras posibilidades de controlar las enfermedades por medio de vacunas, siempre que los determinantes antigénicos apropiados puedan ser definidos y presentados en una forma inmunológicamente activa.

Hemos aprendido a jugar con el DNA y a producir una gran variedad de antígenos. Ahora nos toca estudiar correctamente en el hombre las propiedades inmunológicas de dichos polipéptidos y, en su caso, pulir la configuración final de la molécula o recurrir a las técnicas de potenciación inmunológica. La valoración in vivo de las propiedades de los polipéptidos obtenidos por clonación es lenta como toda investigación clínica y exige el diseño y la realización de ensayos clínicos, con el fin de determinar las dosis unitarias a administrar, el número de dosis, la vía de administración, los intervalos entre las dosis, la reactivación, los adyuvantes, la intensidad, complejidad y duración de la inmunidad. Cada adelanto suscita nuevas preguntas, levanta nuevos problemas, se acompaña de nuevos inconvenientes. Apenas superados unos obstáculos, surgen nuevas interrogaciones: problema-respuesta-nuevos problemas-nueva respuesta. Así vamos progresando, cada uno en la vida, en la profesión médica y en la investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ENGLEBERG, N. C. AND EISENSTEIN, B. I.: *The impact of new cloning techniques on the diagnosis and treatment of infectious diseases*. N. Engl. J. Méd. 1984; 311: 892-901.
2. EISENSTEIN, B. I. AND ENGLEBERG, N. C.: *Applied molecular genetics: New tools for microbiologists and clinicians*. J. Infect. Dis. 1986; 153: 416-430.
3. LACEY, R. W.: Evolution of microorganisms and antibiotic resistance. Lancet 1984; 2: 1.022-1.025.
4. PERKUS, M. E.; PICCINI, A.; LIPINSKAS, B. R.; PAOLETTI, E.: *Recombinant vaccinia virus: Immunization against multiple pathogens*. Science, 1985; 229: 981-984.

5. ZUCKERMAN, A. J.: *New hepatitis B vaccine*. Br. Med. J. 1985; 290: 492-496.
6. DAVIES, J. E.: *Genetic engineering and vaccines*. Ann. Inst. Pasteur/Immunol. 1985; 136 D: 143-150.
7. FENNER, F.: *Vaccination: Its birth, death and resurrection*. Aust. J. Exp. Biol. Méd. Sci. 1985; 63: 607-622.
8. MURRAY, K.: *New routes to drugs, diagnostic agents, and vaccines*. Lancet, 1984; 2: 1.194-1.198.