

Desarrollo de vacunas contra el VIH/SIDA

Recibido el 12 de noviembre de 2007

MARIANO ESTEBAN RODRÍGUEZ*

*Académico de Número de la Real Academia Nacional de Farmacia,
Profesor de Investigación del CSIC, Centro Nacional de
Biotecnología, Madrid*

RESUMEN

La pandemia causada por el virus de la inmunodeficiencia humana HIV-1 continúa afectando a la población mundial, unos 40 millones según la OMS, con 14.000 nuevas infecciones diarias y con más de 22 millones de muertes desde su aparición. Aunque los antirretrovirales pueden controlar la infección, la dificultad de aplicar dichas terapias en países pobres y el hecho de que el virus mute con rapidez y se haga resistente, nos obliga a desarrollar una vacuna eficaz contra el VIH-1. Para alcanzar estos objetivos es necesario un esfuerzo global con un mayor incremento en la diversidad de los esfuerzos en I+D de vacunas del SIDA. Aunque ha habido progresos en el desarrollo de candidatos vacunales, sin embargo aun no se ha conseguido una vacuna con probada eficacia clínica. En esta revisión se analizan retos pendientes, potencial para acelerar el desarrollo de vacunas, aspectos relevantes de la biología del VIH y vacunas en ensayos clínicos. Así mismo se valora el potencial de vectores de poxvirus (estirpes atenuadas MVA y NYVAC) como posibles candidatos vacunales contra el VIH, especialmente los subtipos de B y C que son los de mayor prevalencia. Nuestro grupo, que ha participado en los ensayos preclínicos y clínicos (fase I) obtenidos con dichos vectores nos aportan indicadores inmunológicos que son esperanzadores. El reto es conseguir una vacuna capaz de producir niveles altos de anticuerpos neutralizantes contra los distintos subtipos y variantes del VIH, así como ser capaz de activar linfocitos T CD4+

* **Información de Contacto:**

Dr. Mariano Esteban Rodríguez.

Profesor de Investigación del CSIC, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid

www.cnb.uam.es.

e-mail: mesteban@cnb.uam.es

y CD8+ y células memoria específicas, para inactivar al virus circulante y destruir a las células infectadas.

Palabras clave: vacunas VIH/SIDA, progreso, vectores de poxvirus, MVA y NYVAC.

SUMMARY

Development of vaccines against HIV/AIDS

The pandemic caused by the human immunodeficiency virus (HIV-1) continues unabated worldwide, with about 40 million people infected, 14.000 new infections daily and with more than 22 million deaths since it first appeared. While the combined antiretroviral therapy has been shown to control the disease, however, it is difficult to get implemented in the poor countries and, moreover, the high rate of virus mutation dictates that the only way to control and eliminate the disease will be through the use of an effective vaccine. To reach this goal, it requires a global effort to enhance collaborations and increase R&D funding on HIV vaccines. Although there has been progress in the development of new vaccine candidates, however, not a single candidate has shown protective efficacy in clinical trials. In this revision, we analyzed initiatives, potential to accelerate development of new vaccines, relevant aspects on HIV biology, and current HIV vaccines in clinical trials. We will also evaluate the potential of two of the poxvirus vectors (MVA and NYVAC) as vaccine candidates, particularly for subtypes B and C, the most prevalent HIV strains worldwide, and the information we have obtained through preclinical studies and clinical trials with these vectors. The goal is to generate a vaccine capable of triggering high titer of neutralizing antibodies against the different HIV subtypes and variants, as well as to induce specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes and memory cells in order to eliminate the circulating virus and destroy the HIV infected cell populations.

Key words: HIV/AIDS vaccines, progress, poxvirus vectors, MVA and NYVAC.

ANTECEDENTES

En 2006, más de 5 millones de personas contrajeron la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), lo que supone la mayor cifra de nuevas infecciones registrada en un solo año desde el principio de la epidemia hace más de dos décadas. Al menos 40 millones de personas han contraído la infección por VIH hasta la fecha y se calcula que cada día se producen unas 14.000 nuevas infecciones, o lo que es lo mismo unas 600 cada hora. El SIDA ha causado mas de 22 millones de defunciones y la epidemia global no

muestra signo alguno de abatimiento. Su impacto trasciende diferencias de género, de edad, de orientación sexual, de estatus socioeconómico o nacionalidad (1).

Un 95% de las nuevas infecciones por VIH se da en los países en desarrollo y África se lleva una parte completamente desproporcionada de la epidemia, lo que supone casi dos tercios del total global de personas que viven con VIH/SIDA, pero sólo un 10% de la población mundial. Las diferencias geográficas y económicas de esta enfermedad son evidentes, donde más del 95% de los casos y 95% de las muertes por SIDA ocurren en el tercer mundo (70% en África), sobre todo entre jóvenes adultos, con un incremento progresivo entre las mujeres (OMS, 2005). Es dramático contemplar cómo en África, región sub-sahariana, la epidemia sigue extendiéndose y que en muchos países los porcentajes de personas infectadas y con SIDA son muy elevados, lo que tiene efectos devastadores para las familias y para la economía productiva (2, 3). España continúa siendo el país con mayor número de personas infectadas por el VIH de la Unión Europea (UE).

La pandemia del SIDA se ha convertido en una de las grandes crisis no sólo de salud pública, sino también de desarrollo global. En muchos países, el SIDA está destruyendo los avances en desarrollo tan duramente conquistados durante las últimas décadas: el SIDA lleva a las familias a la pobreza, disminuye la esperanza de vida, incrementa sin descanso el número de huérfanos, infla los gastos sociales y sanitarios y debilita las economías de unos países que se ven incapaces de ser partícipes del desarrollo económico global. Esta erosión constante continuará a menos que consigamos frenar la extensión del SIDA, particularmente en Asia y en África.

Los programas de prevención existentes han ralentizado la extensión de nuevas infecciones en algunos lugares, pero son incapaces de frenar la extensión de la pandemia. Los descubrimientos en tratamientos han producido terapias importantes contra el SIDA, pero estos fármacos no constituyen una cura, y su coste y complejidad de uso los sitúan fuera del alcance de la inmensa mayoría de las personas que los necesitan en el mundo en desarrollo.

La necesidad de asegurar el acceso a tratamientos para los millones de personas que ya sufren de SIDA ha de ser prioridad absoluta

de las actuales políticas del SIDA. Sin embargo, la historia de las enfermedades infecciosas nos enseña con creces que sólo una vacuna preventiva segura y eficaz será capaz de romper el ciclo de nuevas infecciones y de, en última instancia, hacer que revierta y acabe la pandemia: la viruela se erradicó en 1980 gracias a una vacuna eficaz; la polio ya ha desaparecido del continente americano y se espera que esté completamente controlada hacia el final de 2007 (si bien se seguirán administrando vacunas inactivadas en áreas endémicas), el sarampión y la fiebre amarilla se han controlado gracias a vacunas. Una vacuna contra el SIDA debe añadirse cuanto antes a esta lista (4-7).

La ciencia actual del VIH nos indica que las perspectivas de éxito nunca han sido mayores: se ha conseguido la protección en primates no humanos con vacunas experimentales contra el SIDA y por inmunización pasiva con anticuerpos neutralizantes frente al VIH; algunas personas repetidamente expuestas al VIH resisten la infección y generan respuestas específicas contra el VIH, ofreciendo así claves importantísimas para el diseño de vacunas eficaces contra la infección; y los avances espectaculares en el conocimiento de la biología molecular y la ciencia básica del VIH han llevado al desarrollo de nuevas estrategias para la construcción de vacunas eficaces contra este virus.

El posible impacto de la aceleración del descubrimiento de una vacuna contra el SIDA, en términos de infecciones evitadas, vidas salvadas y beneficios económicos para los países pobres sería inmenso. Se espera que en los próximos 3 años y con el ritmo actual de transmisiones se produzcan entre 13 y 19 millones de nuevas infecciones por VIH, aunque las predicciones más pesimistas sugieren que esta cifra podría llegar a los 30 millones. Incluso si una vacuna redujera la transmisión en un cuarto o un tercio, sus beneficios económicos y de salud pública serían enormes.

La necesidad de un esfuerzo global

Sin embargo, para desarrollar una vacuna contra el VIH/SIDA, hemos de superar importantes retos científicos y de organización que necesitan de una respuesta integral y de las contribuciones res-

pectivas de la comunidad global, la Unión Europea y sus estados miembros, incluida España.

No existe una organización o gobierno que pueda acabar por sí sólo con la pandemia del SIDA, de la misma forma que no existe un país, región o comunidad inmune al VIH. Todos debemos desempeñar un papel en el esfuerzo para controlar esta pandemia, de forma que con un mayor compromiso por parte de gobiernos, fundaciones, científicos y empresas, el mundo tenga finalmente una oportunidad real de crear una vacuna para acabar con el SIDA para siempre.

El desarrollo de una vacuna contra el SIDA para salvar vidas y economías habrá de ser uno de los grandes logros de nuestro tiempo. No conseguirlo sería uno de sus grandes fracasos.

Progresos hasta la fecha

En los últimos 10 años los progresos realizados en varias áreas han sido considerables. Las contribuciones tanto de la Iniciativa Internacional por una Vacuna contra el SIDA (IAVI), desde un punto de vista global, como de la Fundación Europea para el desarrollo de una vacuna contra el VIH/SIDA (EuroVacc), de la cual soy miembro Fundador, han sido críticas para la consecución de algunos de los siguientes avances en el campo de la investigación y desarrollo de vacunas contra el SIDA:

- Aumento del número de vacunas candidatas en varias fases de desarrollo e investigación;
- Construcción de capacidad de laboratorio y de centros de investigación clínica para la conducción de ensayos de eficacia en países en desarrollo e implicación de estos países en la búsqueda de vacunas seguras y eficaces;
- Aumento del compromiso político y económico global hacia la I+D en vacunas del SIDA.

Estos progresos resultan aún más significativos si tenemos en cuenta los numerosos y costosos estadios de desarrollo que se necesitan para crear construcciones vacunales viables y para llevarlos a la investigación clínica (o sea, con seres humanos).

Retos pendientes

A pesar de los progresos descritos más arriba, lo cierto es que todavía existen obstáculos de envergadura que dificultan el progreso en el campo de la I+D vacunas del SIDA. Al carecer de incentivos, la industria farmacéutica no ha invertido cantidades significativas de capital intelectual y económico en este ámbito de investigación y, por lo demás, la complejidad de los retos científicos no hace sino desincentivar aún más la asunción de riesgos del capital privado. Por otra parte, la escasez de recursos locales que abruma a muchos de los gobiernos de los países más afectados por la epidemia erosiona su capacidad de liderazgo a la hora de establecer programas de desarrollo de vacunas y asumir un papel fuerte en su defensa junto con los países industrializados más comprometidos en esta empresa.

Los científicos que trabajan en centros académicos, que constituyen el principal grupo de investigadores de nuevos conceptos de vacunas, suelen carecer de los recursos económicos y de la experiencia en asuntos reguladores y de fabricación necesaria para sacar las vacunas del laboratorio y moverlas hacia las etapas de testado clínico y producción a mayor escala. Por último, y a pesar de las contribuciones crecientes de algunos países a la investigación nacional e internacional en vacunas del SIDA, el compromiso financiero y político de muchos gobiernos del mundo continúa siendo insuficiente.

En su *Plan Científico 2004 para Acelerar los Esfuerzos Globales en I+D de Vacunas del SIDA*, hecho público durante la Conferencia Internacional del SIDA de Bangkok en 2004, IAVI examinó los progresos realizados hasta la fecha, identificó los retos pendientes e hizo recomendaciones para fortalecer y acelerar los esfuerzos de investigación. Este documento señala varios retos adicionales, como por ejemplo:

- **Incremento de la diversidad de los esfuerzos en I&D de vacunas del SIDA:** A pesar de que aproximadamente 30 candidatos vacunales se encuentran actualmente en ensayos clínicos, la mayor parte de estas vacunas se centra en una sola estrategia de vacunación conocida como de «inmunidad por mediación celular», lo que en última instancia deja al mundo

sin alternativas en el caso de que esta estrategia no de los resultados esperados.

- **Dar prioridad a los mejores candidatos:** No existe un consenso global sobre cómo deben evaluarse y cómo dar prioridad a las vacunas candidatas para moverlas a las fases de investigación clínica. Además, la posible comparación entre los datos de investigación de distintos candidatos vacunales es limitada.
- **Implicación de los países en desarrollo en ensayos de eficacia:** A día de hoy la capacidad de infraestructuras existentes en los países en desarrollo más castigados por la pandemia permitiría la conducción de un ensayo de eficacia a gran escala o como mucho de dos, a pesar de que la urgencia de la crisis del SIDA requeriría el desarrollo y testado clínico simultáneo de múltiples vacunas candidatas.
- **Financiación del esfuerzo necesario:** En general, la financiación del esfuerzo global en I+D de vacunas contra el SIDA sigue siendo seriamente insuficiente, y ello a pesar de las contribuciones de varios gobiernos europeos y norteamericanos, de la Fundación Bill & Melinda Gates o del Banco Mundial, entre otros. La inversión actual resulta simplemente insuficiente para sufragar un esfuerzo acelerado en I+D de vacunas del SIDA.
- **Aumento de la colaboración:** el campo de las vacunas del SIDA dista de estar configurado de forma óptima para facilitar el desarrollo rápido de una vacuna contra el SIDA. Para mejorar en eficacia y rapidez es necesario que los grupos de investigación compartan más información, que se puedan realizar comparaciones directas entre vacunas candidatas y que los investigadores de más talento trabajen juntos para abordar los retos científicos fundamentales.

Recientemente, hemos sido testigos de un progreso sustancial a la hora de desarrollar respuestas adecuadas a varios de estos retos. Durante la cumbre del Grupo de los 8 (G-8) en 2005, los estados miembros se comprometieron a incrementar su apoyo a las vacunas del SIDA y suscribieron el concepto de una *Global AIDS Vaccine Enterprise*, o «Iniciativa Global para las Vacunas del SIDA». En

Europa, el buen momento generado por la conferencia de Presidentes de la UE en Dublín sobre vacunas y microbicidas continúa creciendo, y el anuncio de Gran Bretaña sobre la posible creación de un instrumento financiero internacional, además de la publicación del informe de la comisión sobre África, constituyen avances muy prometedores. En 2006 la Fundación Bill y Melinda Gates anunció la concesión de 16 proyectos de investigación sobre vacunas del VIH/SIDA con un importe cercano a los 300 millones de dólares (en uno de los proyectos concedidos figura mi grupo), lo que supone un avance considerable de financiación en la búsqueda de una vacuna contra el VIH/SIDA.

EL POTENCIAL PARA ACELERAR EL DESARROLLO DE VACUNAS

Hay dos formas principales de acelerar el descubrimiento y el desarrollo de una vacuna del SIDA: **umentando el número de vacunas candidatas** de alta calidad y viables que entran y avanzan en su desarrollo desde los estudios de seguridad de Fase I hasta los estudios de Fase III y la aprobación del producto; y **umentando la calidad de tales candidatas** y sus posibilidades de progresar con éxito a través de las distintas fases de desarrollo mediante mejoras en la investigación aplicada y en las técnicas de testado de vacunas, como por ejemplo los estándares de medición de laboratorio.

Para conseguir doblar el número de vacunas candidatas viables construidas —lo que reduciría en varios años la consecución de una vacuna de éxito— y para elevar la calidad general de la cantera de candidatas, la inversión en I+D de vacunas del SIDA debe aumentar desde los niveles actuales de alrededor de **600 millones de euros al año hasta aproximadamente unos 1.200 millones de euros al año**.

Aunque es de vital importancia que las autoridades nacionales de salud e investigación continúen apoyando un amplio rango de actividades de investigación básica que conduzcan a la adquisición de nuevos conocimientos científicos sobre el VIH que pudieran traducirse en diseños de vacunas mejoradas, esta investigación básica debe necesariamente complementarse con esfuerzos y recursos aumentados para

abordar las preguntas críticas de ciencia aplicada (por ejemplo, cómo generar respuestas de anticuerpos neutralizadores de amplio espectro), y para dar prioridad al desarrollo y testado de las vacunas más prometedoras en ensayos clínicos sobre el terreno.

Para generar vacunas candidatas susceptibles de entrar en el proceso de desarrollo de producto y superar con éxito las distintas fases de los ensayos clínicos es necesario realizar mayores esfuerzos de inversión en los estadios de ciencia básica y preclínica. Como ya hemos mencionado anteriormente, aunque es cierto que parte de este gasto debe invertirse en centros donde se conducen trabajos iniciados por investigadores en ciencia básica y apoyados por las agencias nacionales de investigación, una parte significativa de los aumentos en inversión deben dirigirse a la investigación centrada en objetivos y conducida por entidades colaboradoras a gran escala.

La creación de una vacuna frente al VIH/SIDA representa un gran reto científico. Las aproximaciones tradicionales de crear vacunas han fracasado, tanto aquellas basadas en virus atenuado de VIH por su capacidad para mutar y recuperar la patogenicidad, como virus VIH inactivado o basado en proteínas purificadas que inducen anticuerpos neutralizantes pero con especificidad sólo del virus homólogo, y no inducen inmunidad celular. Indudablemente nuevas aproximaciones vacunales son necesarias. Comentaremos a continuación aspectos relevantes en la biología del virus y dificultades para desarrollar una vacuna.

EL VIH Y DIFICULTADES

El VIH se transmite principalmente por contacto sexual, transfusión sanguínea y uso de jeringuillas contaminadas, por lo que el virus puede iniciar la infección atravesando la barrera de mucosas o por infección directa de células T o de monocitos/macrófagos en sangre. Debido a que el virus se puede transmitir como virus libre o asociado a las células, su control requiere de la activación de mecanismos inmunológicos que actúen sobre la partícula viral, como serían los anticuerpos neutralizantes o sobre la célula infectada, en el caso de células T citotóxicas. Ello hace que para que una vacuna

sea eficaz es necesario activar tanto la respuesta humoral como la celular. Una dificultad añadida es la alta tasa mutacional del virus lo que conlleva a crear resistencia frente a drogas antirretrovirales y escapar a la acción de los anticuerpos. Cada célula infectada contiene al menos un genoma viral distinto del que causó la infección inicial, lo que origina el fenómeno de «cuasiespecies» y la dificultad para eliminar a todos los genomas virales que se diferencian entre sí por mutaciones en distintas regiones del genoma. Aunque los aislados del VIH son muy diversos en su secuencia, estos virus se agrupan en distintos subtipos, entre los que el subtipo B es el más prevalente en Europa y América del Norte, mientras que el subtipo C se encuentra mayoritariamente en África e India. Aproximadamente el 80% de todas las infecciones por VIH están causadas por los subtipos B y C, de las que el subtipo C representa actualmente el 50% de las infecciones.

Durante el proceso de infección que ocurre por unión del virus a través de la proteína Env con los linfocitos T CD4+ que contienen el receptor de quimioquinas CCR5 o CXCR4, se producen en las primeras horas abundantes partículas infectivas con la consiguiente muerte y destrucción de las células infectadas. La mayor parte de las células infectadas y partículas virales son eliminadas rápidamente por activación de una respuesta inmune específica, pero sin embargo una pequeña población de células infectadas permanecen y van a ser las responsables del mantenimiento de la infección y cronicidad de la misma. Aunque se produce una respuesta inmune humoral, los niveles de anticuerpos neutralizantes son bajos y aparecen después del control inicial de la infección por la respuesta inmune celular. Sin embargo estos anticuerpos no van a poder controlar la infección posterior debido a la aparición de mutantes virales que escapan dicha acción neutralizante. Los datos experimentales apoyan a que es la respuesta celular la que controla la infección viral, tanto durante la infección primaria como en la cronicidad de la infección. Así pues, células T CD8+ aisladas de individuos HIV+ pueden controlar la infección del VIH-1 cuando se añaden a células autólogas CD4+ del mismo paciente y esta inhibición es mediada por acción directa de la destrucción celular por linfocitos T citotóxicos y por la producción de moléculas mediadoras de la acción antiviral, como son quimioquinas (CCL3, CCL-4, CCL-5) y citoquinas (IL-2,

IL-12, IFN-gamma). Niveles altos de linfocitos T citotóxicos CD8+ se asocian con un mejor estado clínico en pacientes seropositivos y crónicos, por lo que una vacuna debe de inducir una potente respuesta celular específica frente al VIH.

Como se mencionó anteriormente, uno de los grandes problemas en el desarrollo de una vacuna frente al VIH es la diversidad genética de las poblaciones virales que se producen durante la infección. Las mutaciones virales se acumulan rápidamente mientras replica el VIH de tal forma que pueden variar entre si, en un 20% en relación a las proteínas mas conservadas y en un 35% en relación a las menos conservadas como Env. Las implicaciones de la diversidad antigénica también puede afectar a la especificidad de la respuesta celular CD8+, por lo que es importante utilizar como inmunógeno varios antígenos virales. Una mutación puntual puede eliminar un epítipo inmunodominante. La presencia de antígenos virales conservados puede favorecer la inducción de una respuesta inmune contra distintos subtipos.

VACUNAS EN ENSAYOS CLÍNICOS

A pesar del esfuerzo considerable que se ha realizado en el desarrollo de una vacuna contra el VIH, hasta hoy solamente la eficacia de un prototipo de vacuna ha sido completada en ensayos en humanos. Se trata de la proteína de la envuelta gp120 administrada junto con el adyuvante alúmina (empresa VaxGen), que aunque había inducido protección en el modelo de chimpancé, sin embargo no demostró eficacia alguna en el ensayo clínico. La vacuna produjo anticuerpos pero no eran capaces de neutralizar aislados del VIH obtenidos de la sangre de personas infectadas. Estos datos supusieron una frustración para la comunidad científica que esperaba mejores indicios de que la inmunización con la proteína gp120 activara alguna respuesta positiva. Uno de los problemas encontrados es que la vacuna se basaba en la forma monomérica de la proteína gp120, mientras que la proteína Env en el virus se encuentra como trímero y asociada al dominio transmembrana gp41, que se separa por acción de proteasas específicas, del tipo furina, cortando el precursor gp160 en gp120 y gp41.

TABLA 1. *Dificultades en el desarrollo de una vacuna eficaz frente al VIH/SIDA.*

<i>Dificultades en el desarrollo de una vacuna frente al VIH/SIDA</i>	
<i>Virus</i>	<p>Hipervariabilidad del VIH</p> <p>Los antígenos requeridos para conferir protección aún no se han identificado</p> <p>El VIH infecta, suprime y destruye las células clave del sistema inmune</p> <p>Existen limitaciones en los modelos animales para estudiar el VIH/SIDA</p>
<i>Respuesta inmune</i>	<p>La inmunidad natural no erradica al virus</p> <p>Los determinantes inmunológicos de protección aún no se han identificado</p> <p>El papel de la inmunidad natural innata está poco estudiado</p> <p>Es posible la re-ínteracción por un segundo aislado del VIH</p>
<i>Transmisión y patogénesis</i>	<p>El VIH se transmite como partícula libre o asociado a las células</p> <p>El VIH se transmite por contacto sexual o por ruta intravenosa</p> <p>El ciclo de replicación del VIH incluye su integración en el genoma del huésped</p> <p>Puede permanecer durante largos períodos de tiempo en estado de latencia</p> <p>Preparación, producción y escalado a fase clásica de los candidatos vacunales.</p>

A pesar del fracaso inicial, se puso en marcha otro ensayo clínico en fase III de eficacia con 16.000 voluntarios en Tailandia utilizando un régimen de administración de dos inmunógenos en combinación (*prime/boost*): una primera inoculación por vía intramuscular (i.m) con el vector ALVAC-HIV (Sanofi-Pasteur), un poxvirus de canarios que expresa varios antígenos del VIH-1 (env y gag-pol de los subtipos B, E), seguido al cabo de un mes por una segunda inmunización intramuscular (i.m) con la proteína gp120 (subtipos, B, E, VaxGen). A finales del año 2007 se conocerán los primeros datos sobre la eficacia de dicho proceso de vacunación. Este ensayo ha recibido grandes críticas de la comunidad científica, ya que tanto ALVAC como gp120 administrados de forma independiente no han aportado datos significativos de inmunogenicidad en humanos, mas bien inducen una pobre respuesta. Nuestro grupo demostró hace años en

modelo de ratón que la inmunización con un vector de poxvirus que expresa el antígeno LACK de *Leishmania infantum* era capaz de inducir protección frente al parásito si se administraba una segunda dosis de proteína purificada LACK antes del desafío (8). Nuestros resultados apoyan que la combinación de los dos inmunógenos, ALVAC+gp120 incrementa el grado de respuesta inmune frente al antígeno del VIH en el ensayo clínico. Así pues, hay que esperar a los resultados de eficacia, pues es difícil de predecir que los experimentos en humanos reflejen lo que se observa en animales. No obstante se reconoce que el protocolo ALVAC+gp120 no es óptimo para conseguir protección frente a la infección por VIH.

Otra de las vacunas potenciales ensayada en fase II es un adenovirus tipo 5 que expresa los genes Gag-Pol-Nef del VIH subtipo B administrada por vía i.m en dos dosis separadas por un mes. Este protocolo conocido como el estudio STEP (referido como HVTN502 o Merk V520-023) se ha realizado con 3000 voluntarios, mayoritariamente población homosexual con alto riesgo, pero no ha dado los resultados esperados de prevenir la infección o reducir la cantidad de virus en las personas que fueron infectadas después de la vacunación, por lo que el estudio se ha interrumpido en el mes de Septiembre de 2007, aunque continúan las visitas programadas de los voluntarios hasta que se completen los datos. También se ha paralizado el estudio HVTN503 (Phambili) en fase IIb iniciado con la misma vacuna de Merk a principios del año 2007 en Sudáfrica con población heterosexual con alto riesgo de infección por VIH. Este estudio tenía como objetivo utilizar tres dosis de Ad5-Gag-Pol-Nef y definir la inmunidad cruzada que puede inducir una vacuna del subtipo B en una población que está infectada con el subtipo C del VIH (denominado «proof-of-concept»). El año pasado se iniciaron 13 nuevos ensayos clínicos en fase I/II en 8 países alrededor del mundo para evaluar la inmunogenicidad y seguridad de las vacunas candidatas (para más información visitar: www.iavireport.org/trialsdb).

Hasta el momento presente, solamente han dado resultados positivos con inducción de una alta respuesta celular frente a los antígenos del VIH las vacunas basadas en adenovirus, poxvirus y DNA. Estos datos aún no se han publicado. La combinación de DNA con adenovirus o poxvirus expresando antígenos del VIH han sido de momento las que han demostrado en protocolos de inmunización en

humanos activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ específicos en más del 90% de los voluntarios inmunizados, aunque mayoritariamente frente a la proteína Env. Debido a que mi grupo de investigación participa en el proyecto europeo de desarrollo de una vacuna contra el VIH basada en poxvirus, describiré los pasos que hemos seguido en la generación y caracterización de dos vectores de poxvirus (llamados MVA y NYVAC) a los que hemos incorporado los antígenos Env/Gag-Pol-Nef del VIH subtipos B y C. Este trabajo se inició con ayudas de la Unión Europea (Eurovac I, II, III, 1999-2007) y se continúa con ayudas de la Fundación FIPSE, Fundación Botín y Fundación Bill y Melinda Gates.

Me limitaré a hacer una introducción sobre el uso de poxvirus como vacunas para luego describir aspectos relevantes de la biología de los vectores candidatos vacunales, MVA y NYVAC, generación de recombinantes que expresan cuatro antígenos del VIH y su caracterización preclínica en modelos de ratón y en macacos, así como su valoración en ensayos clínicos en fase I.

POXVIRUS RECOMBINANTES COMO VACUNAS CONTRA DISTINTAS ENFERMEDADES

La demostración en 1982 por los grupos de Bernie Moss y de Enzo Paoletti en EE UU de que en el genoma del virus *vaccinia* se podía incorporar de forma estable una gran variedad de genes procedentes de otras especies y que por inoculación de estos virus recombinantes a animales se les podía conferir protección frente a un patógeno, supuso una revolución en el campo de las vacunas (9). Por primera vez se consideró que un poxvirus se podría utilizar como posible vacuna contra otros patógenos, siempre y cuando no provocara efectos secundarios y dicha vacuna demostrara su eficacia. Además, la experiencia de campo acumulada con la práctica de la vacunación contra viruela hacía posible que vacunas basadas en poxvirus pudieran tener una amplia distribución mundial.

Los fundamentos para producir un poxvirus recombinante se basan sencillamente en generar un plásmido de inserción (vector de transferencia) que contiene el gen de interés flanqueado por regiones codificadoras, a la izquierda y derecha, de un gen no esencial del

poxvirus, como el gen timidina quinasa o hemaglutinina y un gen marcador, como la β -galactosidasa o la proteína verde fluorescente (GFP). El gen de interés tiene su expresión controlada bajo un promotor viral fuerte que se activa a tiempos tempranos y tardíos en la infección. Mediante un proceso de infección de células animales en cultivo con un poxvirus seguido de la introducción del plásmido de inserción por transfección, se produce durante unas 24 h un proceso de recombinación específica de secuencia entre las regiones flanqueantes del plásmido de inserción y el locus homólogo del gen viral. El aislamiento de virus recombinante se realiza por seguimiento del gen marcador que, si es β -galactosidasa, se detecta por la producción de placas de color azul en presencia de su sustrato, o si es GFP, por la fluorescencia verde. Existe una gran variedad de marcadores, tanto enzimáticos como antibióticos para la selección de virus recombinantes (10). Para el uso de estos vectores como vacunas en humanos se requiere que el gen marcador no esté presente en el virus recombinante, por lo que en estos casos se utilizan plásmidos en los que el gen marcador se elimina por recombinación homóloga entre los sitios flanqueantes.

El éxito de la utilización de vacunas basadas en poxvirus se demostró en los estudios de campo llevados a cabo en Europa y EEUU con un virus recombinante de *vaccinia* que expresaba la proteína de la envuelta del virus de la rabia. Se observó que la administración de esta vacuna en cápsulas comestibles inducía una respuesta inmuno-protectora contra la rabia en animales que transmiten la enfermedad, como el zorro (11). De esta forma se ha generado una gran variedad de poxvirus recombinantes contra enfermedades virales (gripe, encefalitis, enteritis, fiebres hemorrágicas, hepatitis, sida), bacterianas (neumonías), parasitarias (malaria, leishmania), tumorales (melanoma, adenocarcinoma, tumor prostático), que se encuentran en fase de experimentación clínica.

Para evitar algunos efectos no deseados que se observaron en las campañas de vacunación contra la viruela, se han generado virus recombinantes altamente atenuados y seguros para la vacunación contra patógenos y tumores (9, 12, 13). Uno de los candidatos que está en experimentación clínica en fase I/II es el virus *vaccinia* modificado de Ankara, (MVA), que fue obtenido después de más de 500 pases seriados en células primarias de embrión de pollo y que

fue administrado a más de 120.000 personas en Alemania durante la campaña de vacunación contra la viruela. Estudios recientes han demostrado que la inoculación de MVA recombinante que expresa antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) confiere protección contra la enfermedad producida en simios por un híbrido (SIVH) del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIV) conteniendo antígenos del VIH. Actualmente hay una serie de ensayos clínicos en humanos contra malaria, sida y tumores utilizando virus recombinantes de MVA en combinación con otros vectores (13).

Estudios pioneros de vacunación frente a malaria, en los que participó nuestro laboratorio junto con los grupos de Ruth Nussenzweig y Fidel Zavala en New York University Medical Center y de Peter Palese y Adolfo García-Sastre en Mount Sinai de NY, demostramos en una serie de publicaciones que se podía expandir la población de células T CD8+ específicas para el antígeno CS (circumsporozoito) por administración sucesiva de dos vectores y que el orden de administración era fundamental para obtener protección frente a *Plasmodium yoelii* (14). Establecimos que si se lleva a cabo un protocolo de inmunización con una primera inoculación de un vector del virus de la gripe (influenza) que expresa el epítipo de CS específico para células T CD8+, seguido al cabo de dos semanas por una segunda inoculación con un vector de poxvirus (*vaccinia* o MVA) que expresa la proteína completa CS, se produce al cabo de 10 días una ampliación de la respuesta celular CD8+ específica frente a CS que induce protección (90%) frente a la forma infectiva del parásito, esporozoitos de *Plasmodium yoelii* que producen la malaria murina. La protección se correlacionó con un alto grado de respuesta celular específica contra la proteína del circumsporozoito (CS) de plasmodio. Demostramos que este procedimiento de inmunización combinada de distintos vectores (*prime/boost*) inducía una respuesta inmunológica de tipo Th1 (caracterizada por la producción de las citoquinas IFN- γ y IL-12), manteniendo la presencia de linfocitos citotóxicos CD8+ durante largos períodos de tiempo que aún protegían (en un 60%) contra malaria (15, 16). Este procedimiento de *prime/boost* para expansión de células CD8+ ha sido confirmado por otros grupos utilizando como primera inoculación vectores que pueden ser DNA, proteínas, pseudo-partículas, ó virus atenuado expresando el gen de interés, seguido de una segunda inoculación con un

MVA recombinante que expresa el mismo gen. Estos protocolos de *prime/boost* están siendo aplicados a otros sistemas de vacunación contra patógenos y ampliamente aceptados como regímenes de inmunización eficaz (17). Estos resultados, han servido para aumentar el interés de los poxvirus como vacunas, ya que el proceso de *prime/boost* con vectores heterólogos ha demostrado su eficacia en distintos modelos animales. Además, hemos demostrado que es posible inducir una fuerte respuesta inmune en mucosas frente a antígenos del VIH mediante la inoculación por vía respiratoria de recombinantes del virus de la gripe y de MVA (18).

¿Que ocurre en el proceso de *prime/boost*? Hemos propuesto que durante la primera inoculación (*priming*) se produce una activación moderada de linfocitos T CD8+ específicos frente a unos pocos epítopos del antígeno, y que después de la segunda inoculación con el poxvirus recombinante (*boost*) expresando el mismo antígeno, se produce una expansión de la población de células T CD8+, además del efecto *priming* en células inmunológicamente vírgenes (17). Las células que fueron activadas en la fase inicial reaccionan más rápidamente y se expanden. Actualmente el grupo que lidera el español Pedro Alonso está llevando a cabo ensayos clínicos de eficacia en Mozambique con una vacuna basada en la proteína CS fusionada al antígeno de la hepatitis B junto con un adyuvante, obteniendo un 50% de protección frente a casos de malaria en la población de niños menores de cinco años. Es predecible que estos porcentajes puedan aumentar por inmunización de distintos vectores expresando el mismo antígeno, como MVA, o con una combinación de otros antígenos de *Plasmodium*.

Lógicamente cuando se utilizan vectores víricos se produce una respuesta inmune frente al vector que reduce su capacidad inmunogénica al utilizar el mismo vector como *boost*. La respuesta inmunológica que se produce frente al vector se puede evitar mediante el uso de vectores basados en estirpes de poxvirus distintos, ya que hay una pobre reactividad cruzada entre ellos. Esta respuesta inmune frente al propio vector está disminuida en mutantes cuya replicación en células humanas se limita a la fase temprana, como avipoxvirus, o que sólo completan un ciclo de replicación sin progenie como MVA. Es predecible que en pocos años se utilicen vacunas basadas en vectores de poxvirus contra una gran variedad de enfermedades.

LOS VECTORES VIRALES MVA Y NYVAC

Dos de los vectores mas prometedores para su uso como vacunas que activan respuesta celular de forma específica son el virus modificado de Ankara (MVA) y el virus vaccinia NYVAC. Se ha demostrado, entre otros por nuestro grupo, que tanto MVA como NYVAC inducen una potente respuesta celular contra antígenos de distintos patógenos, y lo mas importante es que esta respuesta inmune confiere protección después del desafío. El vector MVA fue generado después de mas de 500 pases en células embrionarias de pollo, habiendo perdido unas 30.000 pares de bases de su secuencia, con la eliminación de genes virales que interfieren con el sistema inmune y con el rango de hospedador (13). NYVAC fue generado por ingeniería genética mediante la eliminación selectiva de 18 genes (unos 15.000 pares de bases) implicados en virulencia, rango de hospedador y patogenicidad (19).

La ventaja de ambos vectores es que han demostrado su seguridad tanto en modelos animales como en los ensayos clínicos llevados a cabo en fase I/II en humanos. Además, estos vectores han demostrado su inmunogenicidad y capacidad para conferir protección en distintos modelos animales. Nuestro grupo ha venido trabajando en la biología de ambos vectores en modelos *in vitro* con células en cultivo, y en modelos *in vivo* con ratones.

Describiré a continuación algunas de las características diferenciales entre los dos vectores. Durante la infección de células humanas HeLa en cultivo con MVA se produce un menor efecto citopático que con NYVAC, hay formación de células bipolares, se favorece la acumulación de partículas inmaduras con aumento en los niveles de proteínas al no activarse la fosforilación del factor de iniciación eIF-2 alfa, y se produce una mayor viabilidad de la célula infectada al no inducir apoptosis (20, 21). Cuando se inoculan ambos vectores en ratones por ruta i.m se produce replicación viral entre las 24-48 horas después de la infección, con posterior eliminación del virus, lo que garantiza la seguridad de los dos vectores. Esto se observa con recombinantes que expresan el gen luciferasa.

Sin embargo la infección de células inmaduras dendríticas humanas con MVA y NYVAC provoca un aumento en los niveles de expre-

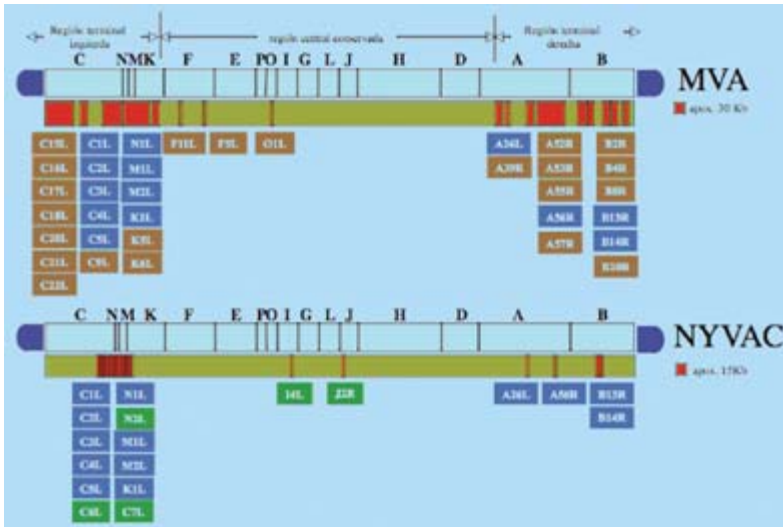


FIGURA 1. **Análisis comparativo de los genomas de MVA y de NYVAC.** En marrón se muestran los genes deletados en MVA e intactos en el genoma de NYVAC, en azul las deletaciones comunes en ambos genomas y en verde los genes inactivados en NYVAC e intactos en MVA. Los genes han sido nombrados según la nomenclatura correspondiente a la cepa Copenhagen.

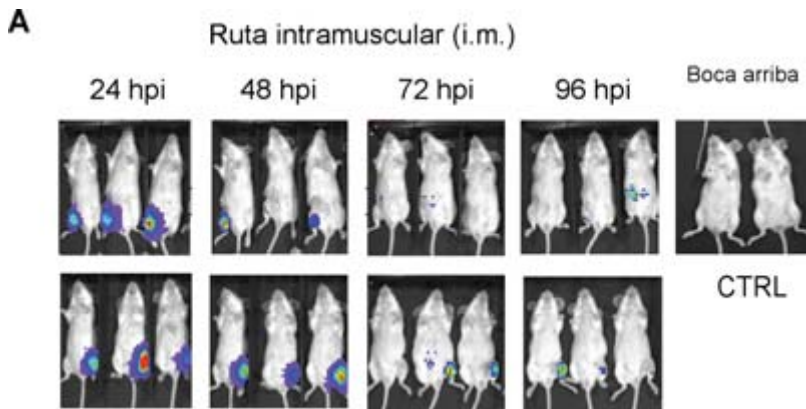


FIGURA 2. **Distribución de MVA luc y NYVAC luc en ratones inoculados por ruta intramuscular.** (A) Localización de la señal de luciferasa en ratones BALB/c inoculados por ruta intramuscular con los recombinantes MVA luc o NYVAC luc a distintos tiempos postinfección. En la esquina superior derecha se muestra la falta de señal procedente de los ratones inoculados con PBS (CTRL).

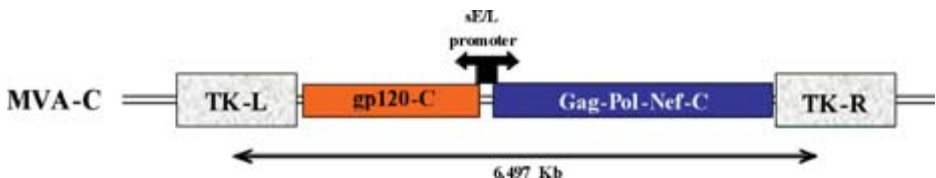
sión de un gran número de moléculas inmunomoduladoras (ej. IFN tipo I, TNF-alfa, IL-12, OASL, MDA5, RIG), aunque MVA induce un mayor número de genes que NYVAC. Estos datos han sido demostrados por microarrays conteniendo unos 20.000 genes humanos. Hemos llevado a cabo una clasificación de los genes humanos, tanto en células HeLa como en células dendríticas, que se activan en respuesta a cada uno de los virus, MVA y NYVAC (22-25). El análisis detallado de la respuesta inmune inducida por MVA frente a los distintos antígenos reveló una activación mayoritaria de células T CD8+ mientras que NYVAC activó preferentemente células T CD4+ (Mooij y cols., manuscrito en prensa). Estos resultados demuestran que tal y como habíamos planteado, MVA y NYVAC inducen respuestas inmunológicas diferentes. Existen varios factores que podrían explicar los diferentes mecanismos de inducción de la respuesta inmune. Evidencias recientes indican que tanto para la expansión clonal de las células T CD8+, como para el desarrollo de sus funciones efectoras o el establecimiento de una población de memoria, es necesario la presencia de una señal de citoquinas, denominada «tercera señal» (26, 27). Esta tercera señal proviene de la secreción por parte de la célula dendrítica madura de citoquinas como IL-12 y/o IFN del tipo I (IFN α/β), cuya activación es mediada por una cascada de señalización distinta a la activada por el TCR y la molécula coestimuladora CD28. Si analizamos el perfil de genes activados tras la infección con MVA de células dendríticas humanas (25) podemos observar que existe un aumento significativo en la expresión a nivel de ARN mensajero de genes como IL-12, IFN- α e IFN- β , así como un incremento del factor regulador del IFN IRF-7 y de proteínas implicadas en la producción de IFN tipo I como RIG-I o MDA5. Consecuentemente, se observa una mayor regulación de genes estimulados por IFN (ISGs) como ISG56, ISG60 o SCYB10. Además, el programa de diferenciación activado por la secreción de IL-12 junto con IFN α/β incrementa la expresión de un gran número de genes implicados en otras funciones como el gen GADD45B (28) o el factor de transcripción NFAT5 (29) que intervienen en la regulación de las células efectoras; o genes implicados en la señal de transducción (MAP2K5) y en la regulación del ciclo celular (Ciclina B1); o miembros de la familia de los TNF (30). Todos ellos, se encuentran consistentemente aumentados durante la infección por MVA. Además, otros genes implicados en la modulación de la respuesta inmune como son las

citoquinas pro-inflamatorias o la producción de β -quimioquinas también se expresaron diferencialmente en MVA y NYVAC. Todos estos datos apoyan la preferencia de MVA en la estimulación de células T CD8+.

Estos resultados y otros obtenidos con anterioridad nos demuestran que vacunas basadas en estos dos vectores pueden inducir de forma diferencial distintos grados de respuesta inmune, lo que puede ser beneficioso en su uso como vacunas. Describiré a continuación cómo hemos aplicado estos dos vectores para generar dos vacunas potenciales frente al VIH y llevado a cabo su caracterización preclínica en ratones.

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN PRECLÍNICA DE DOS NUEVAS VACUNAS POTENCIALES FRENTE AL VIH, SUBTIPOS B Y C

Nuestro laboratorio participa en el proyecto europeo de desarrollo de una vacuna contra el SIDA (www.eurovacc.org), para lo cual generamos y patentado dos virus recombinantes de MVA que expresan en un mismo locus viral (timidina quinasa) los genes *env/gag-pol-nef* del VIH procedente de aislados europeo (serotipo B, llamado MVA-B) y asiático (serotipo C, llamado MVA-C).



Hemos caracterizado estos virus recombinantes por su capacidad para expresar niveles altos de los cuatro antígenos, conservar intacta la secuencia y mantener durante al menos 10 pases sucesivos los mismos niveles de expresión. Se ha llevado a cabo una serie de experimentos en modelos de ratón (Balb/c y humanizados HHD para HLA-A2) para demostrar la capacidad de estos recombinantes en inducir respuestas inmunes específicas (humoral y celular) después de procedimientos de inmunización combinada de dos vectores. La

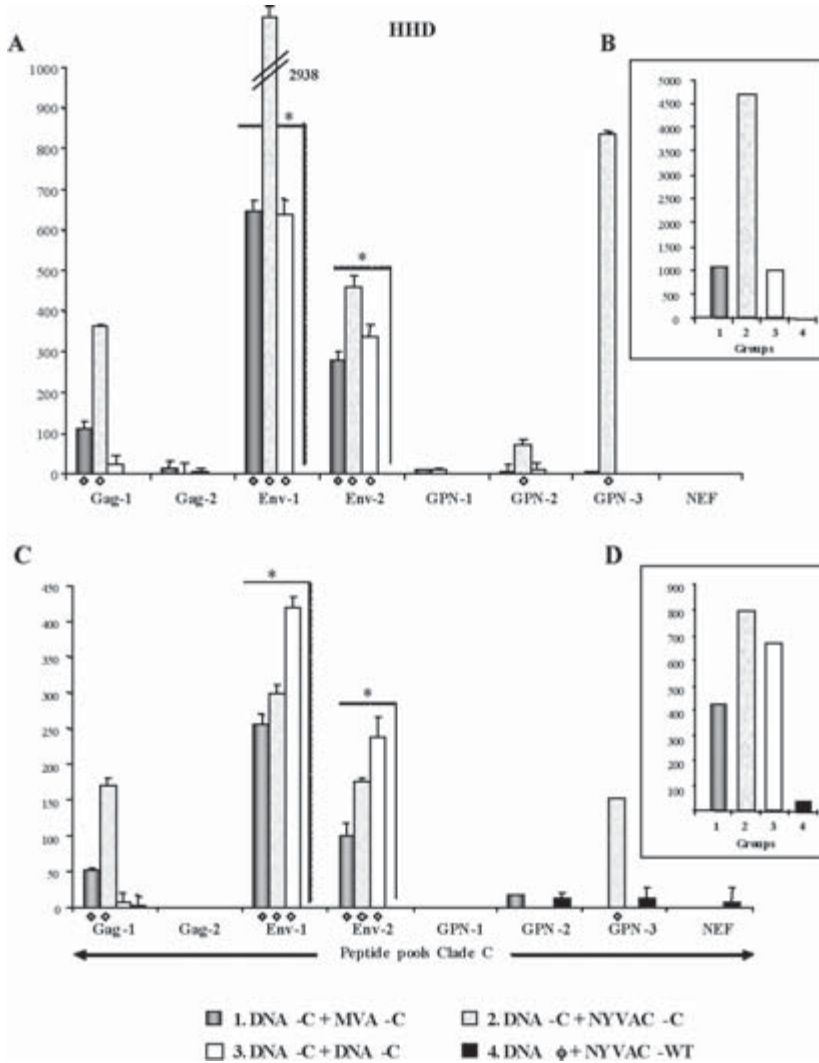


FIGURA 3.- *Inmunogenicidad de MVA-C y NYVAC-C después del protocolo de inmunización de prime-boost (ADN/Pox) en ratones BALB/c.* La respuesta inmune celular específica frente a los antígenos de VIH en los animales inmunizados se determinó mediante la técnica de ELISPOT. En la figura se muestra el número de células secretoras de IFN- γ e IL-2 específicas para cada mezcla de péptidos (A y C) así como la respuesta específica frente a todos los antígenos de VIH-1 incluidos en los vectores (B y D). ? representa diferencias significativas respecto a la mezcla de péptidos control * representa diferencias significativas entre los diferentes grupos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$).

primera inmunización se realizó con un vector de DNA que expresa los cuatro antígenos (*env/gag-pol-nef*) seguido a las dos semanas por una segunda inmunización con el vector de MVA también expresando los cuatro antígenos. Estos estudios se han realizado en paralelo comparando la inmunogenicidad de MVA frente al vector NYVAC que expresa los mismos antígenos y que fue generado por la empresa Sanofi-Pasteur. Los datos obtenidos nos demuestran que los vectores basados en MVA y NYVAC inducen una amplia respuesta inmune frente a los antígenos Env-Gag-Pol-Nef del VIH, subtipos B y C. Esta respuesta es mayoritaria frente a Env en relación a los otros antígenos, demostrando la inmunodominancia que ejerce Env (31, 32). Como ejemplo se incluye el grado de respuesta inmune inducida por los vectores MVA-B y NYVAC-B después de la inmunización combinada DNA/pox.

Los resultados obtenidos en ratones con los vectores MVA y NYVAC fueron seguidos por experimentos semejantes en monos (macacos). Como el VIH no infecta macacos, la pregunta que nos hicimos fue ver si recombinantes de MVA y NYVAC en construcciones semejantes a las utilizadas en ratones, pero ahora expresando antígenos equivalentes del virus de la inmunodeficiencia de simio (SIVmac239) eran capaces de inducir protección frente al virus patógeno de monos SHIV89.6p (este es un virus híbrido al que se le ha reemplazado el gen Env del SIV por el equivalente Env del VIH, subtipo B (aislado 89.6p) y que es altamente patogénico en macacos. Con esta finalidad, en mi laboratorio se construyeron por Carmen E. Gómez los vectores de MVA y NYVAC que expresaban en el mismo locus de la timidina quinasa viral, los genes *env* del HIV-89.6p y *gag-pol-nef* del SIVmac239. Estos vectores expresaban correctamente las cuatro proteínas Env-Gag-Pol-Nef. En colaboración con Johnatan Heeney, miembro de EuroVacc, del Centro de Primates de Holanda, llevamos a cabo experimentos semejantes a los realizados en ratones. Así, grupos de 7 macacos fueron inoculados en procedimientos de DNA *prime/poxvirus boost* con los vectores de DNA que expresaban los cuatro antígenos seguido de una segunda inoculación con los vectores MVA y NYVAC expresando los mismos antígenos. Un mes después de la última inoculación, los animales fueron desafiados por vía intravenosa con el virus SHIV89.6p y al cabo del tiempo se examinaron varios parámetros inmunológicos, así como protec-

ción frente al virus híbrido de simio. Los resultados obtenidos demuestran que tanto MVA como NYVAC inducen respuesta celular específica frente a los cuatro antígenos con predominancia de Env, que los niveles de células CD4+ se mantienen durante más de un año en los grupos inmunizados y no en los grupos control (inoculados con plásmido vacío y poxvirus sin inserto) y, lo más importante, que se producía protección frente a la infección. Mientras se murieron los animales del grupo control, sin embargo los animales de los dos grupos inmunizados con los vectores recombinantes de MVA y NYVAC resultaron protegidos frente a la infección por SHIV (Mooj et al, manuscrito aceptado en *J. Virol*). También hemos demostrado en macacos que los vectores recombinantes de MVA y NYVAC pueden ser utilizados (aerosol) para inducir respuestas inmunes específicas frente a distintos antígenos cuando son inoculados por rutas de mucosas (Corbett et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, en prensa).

ENSAYOS CLÍNICOS EN FASE I CON LOS VECTORES NYVAC Y MVA

Para realizar ensayos clínicos lo primero es producir los vectores en condiciones de buenas prácticas de producción (GMP) y demostrar su seguridad en modelos animales. A través del proyecto EuroVacc, el vector NYVAC-C (que expresa Env-Gag-Pol-Nef del VIH subtipo C, CN54) fue producido por Sanofi-Pasteur y ha sido el primero de los vectores contemplados en el programa EuroVacc en ser ensayado en fase I. El vector MVA-B que generamos en mi grupo (expresa Env-Gag-Pol-Nef del VIH, gp120 de BX08 y Gag-Pol-Nef del subtipo IIIB) (31), fue producido por la empresa IDT en Alemania. Tanto el vector NYVAC-C como MVA-B demostraron su bioseguridad en los modelos animales. En el momento presente se han llevado a cabo dos ensayos clínicos con NYVAC-C (denominados EVO1 e EVO2), distribuidos entre los centros clínicos de Lausanne y Londres, con voluntarios sanos para demostrar su seguridad e inmunogenicidad. En el EVO1 con 24 voluntarios que recibieron por vía i.m dos dosis de NYVAC-C espaciadas por un mes, se observó durante 48 semanas que la vacuna era segura, sin efectos secundarios, y que cerca del 40% de los individuos desarrollaban una respuesta celular específica frente a los antígenos del VIH. Esta respuesta inmune era

mayoritaria frente a Env. En EVO2, un segundo ensayo clínico en fase I (iniciado en 2005 y terminado en 2006) se procedió a demostrar si la inoculación i.m, primero con un vector de DNA que expresaba los cuatro antígenos del VIH-1 (Env/Gag-Pol-Nef) seguido un mes después por una segunda inoculación i.m con NYVAC-C era un protocolo mas inmunogénico que cuando se utilizaba solo el vector NYVAC-C. Un número equivalente de voluntarios en Londres y Lausanne (24 voluntarios) como en el primer ensayo clínico, fueron inoculados con la combinación DNA-C/NYVAC-C y a distintos tiempos se siguió la evolución de las inmunizaciones. Se observó que la combinación era segura y que se producía un incremento considerable de la respuesta inmune en los voluntarios inmunizados frente a los antígenos del VIH. Mientras que el grupo control (placebo) no dio respuesta alguna, la mayoría de los voluntarios inmunizados (90%) respondieron al protocolo DNA-C/NYVAC-C de inmunización con inducción de respuesta inmune específica frente a los antígenos del VIH. De nuevo, la respuesta inmune fue dirigida mayoritariamente frente a la proteína Env, aunque la media de respuesta fue dirigida contra cuatro epítomos. La respuesta inmune celular fue polifuncional del tipo Th1, con producción de linfocitos CD4+ y CD8+ específicos frente a VIH (Harai et al., J. Exp. Med., en prensa). Estos datos son muy relevantes ya que con el protocolo DNA/NYVAC se conseguía que prácticamente todos los individuos respondieran a la inmunización, algo que no se había obtenido con otros protocolos de inmunización y que había frustrado la aspiraciones de muchos grupos intentando desarrollar una vacuna frente al VIH/SIDA. Así pues, se había conseguido franquear la barrera de que sí era posible producir un inmunógeno que cumplía con principios básicos en inmunología, es decir, que para poder ser eficaz necesita primero activar una respuesta inmune específica frente a los antígenos del patógeno que se quiere controlar (esto no quiere decir que cualquier respuesta inmune sea efectiva). El siguiente ensayo clínico EVO3 se ha iniciado a finales de verano de 2007 con el protocolo DNA/NYVAC (tres dosis de DNA-C y una de NYVAC-C) pero con mayor número de voluntarios y se está planificando otro ensayo (EVO4) de eficacia en fase IIB en África.

En relación al vector MVA-B que hemos generado en el CNB, en 2007 se ha llevado a cabo en Holanda un ensayo terapéutico con

pacientes seropositivos y con niveles de CD4 por encima de 200/mL en sangre. El vector MVA-B se administró por vía i.m en dos dosis separadas entre si por un mes. El objetivo es demostrar si se puede aumentar la respuesta inmune celular dirigida especialmente a linfocitos CD8+ y mantener la población de linfocitos CD4+ en los individuos infectados (los datos se están procesando). Por otro lado hemos iniciado en España, mediante colaboración entre los hospitales Clinic de Barcelona y Gregorio Marañón de Madrid, los trámites para realizar un ensayo profiláctico en fase I con el vector MVA-B administrado en tres dosis sucesivas, espaciadas entre si. El objetivo es demostrar la inmunogenicidad de MVA-B en voluntarios sanos. Esperamos iniciar el ensayo a principios del año 2008.

HACIA UNA SEGUNDA GENERACIÓN DE VACUNAS BASADAS EN POXVIRUS

Debido a que la familia de poxvirus codifica por una serie de proteínas que interfieren con el sistema inmune y así escapar de las defensas del organismo (33), es importante mejorar la capacidad inmunogénica de estos vectores y producir vectores de nueva generación con mayor capacidad para estimular respuestas inmunes frente al antígeno recombinante. Nuestro grupo ha demostrado que se puede mejorar el comportamiento del vector MVA frente al VIH mediante la incorporación en el genoma viral de genes inmunomoduladores, como las citoquinas IL-12, IFN- γ y el factor GM-CSF (34-36). En un proyecto financiado por el VI Programa de la UE tenemos como objetivo el identificar los genes de MVA que una vez deletados produzcan en animales un incremento de la respuesta inmune frente a distintos antígenos expresados por recombinantes de MVA. El genoma de éste virus no contiene receptores solubles de citoquinas, como IFN- α/β , IFN- γ , TNF o la proteína que se une a quimioquinas. Hemos propuesto que para una mayor eficacia de *vaccinia* como vacuna es necesario inactivar selectivamente inhibidores virales del sistema inmune o incorporar citoquinas en el genoma del virus (34). De esta forma se podrá modular la respuesta inmune frente a antígenos. Nuestro laboratorio ha demostrado que esta segunda aproximación es eficaz, al observar que la expresión de IL-12 puede modular de forma positiva o negativa (por producción

de óxido nítrico) la expansión de células T CD8+ específicas frente a la proteína Env del VIH (37). Utilizando IL-12, hemos establecido un protocolo de inmunización combinada de *prime/boost* con DNA y un recombinante de *vaccinia* expresando ambos la proteína Env de VIH que aumenta fuertemente la producción de células T CD8+ específicas para VIH. Debido al papel tan importante que tiene IL-12 en la regulación del sistema inmune, polarizando el sistema hacia el subtipo Th1 y a su interés en terapia antiviral, antitumoral e inmunomoduladora, y al efecto sinérgico que IL-18 ejerce sobre IL-12 en protección (36), estamos llevando a cabo un estudio sobre optimización del uso de estas citoquinas en protección frente patógenos en modelos animales. También estamos inactivando de forma selectiva genes de MVA y de NYVAC que codifican por inhibidores de citoquinas, quimioquinas, TLRs, apoptosis y que definen el rango de hospedador, para usarlos como vectores vacunales contra distintas patologías.

Nos hemos propuesto como continuación a nuestras investigaciones llevar a cabo un estudio detallado de optimización y caracterización de la respuesta inmune por vectores de las cepas atenuadas de *vaccinia* MVA y NYVAC que expresan antígenos del VIH. Así pues, en los próximos años generaremos nuevos vectores atenuados de MVA y NYVAC con deleciones e inserciones específicas y se estudiará la respuesta inmune y capacidad de inducir protección en modelos animales (ratón y monos). La finalidad es obtener un vector modelo de MVA/NYVAC que reúna todas las condiciones óptimas de inducción de una fuerte respuesta celular específica frente a las proteínas del VIH, para su ensayo clínico como vacuna de segunda generación frente al VIH/SIDA.

CONSIDERACIONES FINALES

Desde que apareció la epidemia de SIDA y se identificó al VIH como agente causal en la década de los años 80, ha habido un esfuerzo global para desentrañar su estructura, organización genómica, tasa mutacional, mecanismos de replicación, capacidad para infectar células específicas del organismo, destruirlas y seguir su ciclo perverso de multiplicación hasta que termina con la vida de la persona infec-

tada. Estas investigaciones tenían como objetivo el desarrollo de sistemas de control de la infección, como antirretrovirales y vacunas. Estos conocimientos nos han enseñado que el virus es una máquina perfecta que se pone en funcionamiento tan pronto como inicia el proceso de infección y elude, a través de sus múltiples funciones, a la acción de la respuesta inmune innata y adquirida con la finalidad de mantenerse de forma permanente en el organismo. La alta tasa mutacional, su incorporación en el cromosoma celular y la estrategia que el virus utiliza evadiendo la respuesta inmune del huésped al infectar a las células clave en defensa como son los linfocitos T CD4+, todo ello ha dificultado el desarrollo de una vacuna. Organizaciones internacionales, como el G-8, las Naciones Unidas, el Banco Mundial, los Institutos Nacionales de Salud de EE.UU, la Unión Europea, la Fundación Bill y Melinda Gates y otras, están aportando ayudas económicas en I+D en vacunas del VIH/SIDA. Es indudable, como hemos comentado en este trabajo, que a la vista de los resultados obtenidos hasta el momento hace falta un mayor esfuerzo global para conseguir controlar y erradicar al VIH/SIDA en el mundo.

Recientemente, mediante el desarrollo de nuevos inmunógenos hemos sido capaces de poder activar de forma específica la respuesta inmune celular, especialmente los linfocitos T CD4+ y CD8+, frente a los antígenos del VIH. Estas nuevas vacunas celulares van dirigidas a eliminar del organismo a las células infectadas y así convertir la infección en crónica. Otras estrategias en fase de desarrollo son las que van orientadas a producir anticuerpos neutralizantes frente al VIH, aunque este campo aun no ha dado los resultados esperados. En una reciente publicación en febrero en la revista Nature (33), se ha identificado el sitio de unión de un anticuerpo neutralizante (llamado b12) frente a distintas estirpes del VIH con la proteína gp120, exactamente el mismo sitio de unión de gp120 con el receptor de las células CD4+. Este descubrimiento supone un avance considerable hacia el desarrollo de inmunógenos para que la proteína Env induzca anticuerpos neutralizantes. Este es un área en continua expansión, aunque con muchas dificultades ya que para neutralizar al VIH hace falta conseguir en plasma altos niveles de anticuerpos neutralizantes con amplia especificidad frente a variantes virales.

Es indudable que para conseguir controlar la infección por VIH es necesario que una vacuna sea capaz de producir altos niveles de

anticuerpos neutralizantes contra distintos variantes y estirpes del VIH, así como ser capaz de activar linfocitos T CD4+ y CD8+ y células memoria capaces de reconocer y destruir a las células infectadas. Ese es nuestro reto.

AGRADECIMIENTOS

Mi agradecimiento al todo el personal de mi laboratorio por su gran dedicación para que el trabajo de cada día sea sencillo pero en vanguardia de la ciencia y muy especialmente al grupo del VIH, Carmen E. Gómez, José L. Nájera, Beatriz Perdiguero, Paul Heinen, Juan F. García, Jacobo Nieto, Raquel Sánchez y Victoria Jiménez. También quiero agradecer a IAVI por su colaboración en la elaboración de un documento que sobre la situación en I+D de vacunas VIH presentamos a Presidencia de Gobierno, recogándose en esta presentación algunos puntos del mismo. El trabajo de mi grupo no hubiera sido posible sin la financiación que nos han concedido distintas instituciones y fundaciones nacionales (Ministerio de Educación y Ciencia, Ministerio de Sanidad y Consumo, Comunidad de Madrid, Fundación Marcelino Botín, FIPSE) e internacionales (Institutos Nacionales de Salud, NIH, de EE.UU, Unión Europea, Fundación Bill y Melinda Gates). Buena parte de este trabajo fue presentado en mi discurso de ingreso en 2007 como Académico Correspondiente de la Academia de Farmacia de Galicia.

REFERENCIAS

- (1) WHO/UNAIDS convene meeting on vaccine clinical trial design. (2006) *IAVI Rep.* 10 (2): 20.
- (2) BARTH-JONES, D.C.; CHENG, H.; KANG, L.Y.; KENYA, P.R.; ODERA, D.; MOSQUEIRA, N.R.; ET AL. (2005) Cost effectiveness and delivery study for future HIV vaccines. *Aids.* 19 (13): 1-6.
- (3) KAUFMANN, S.H. AND MCMICHAEL, A.J. (2005) Annulling a dangerous liaison: vaccination strategies against AIDS and tuberculosis. *Nat. Med.* 11 (4 Suppl): S33-44.
- (4) HOKEY, D.A. AND WEINER, D.B. (2006) DNA vaccines for HIV: challenges and opportunities. *Springer Semin. Immunopathol.* 28 (3): 267-79.
- (5) KEGELES, S.M.; JOHNSON, M.O.; STRAUSS, R.P.; RALSTON, B.; HAYS, R.B.; METZGER, D.S.; ET AL. (2006) How should HIV vaccine efficacy trials be conducted? Diverse U.S. communities speak out. *AIDS Educ. Prev.* 18 (6): 560-72.

- (6) LETVIN, N.L. (2006) Progress and obstacles in the development of an AIDS vaccine. *Nat. Rev. Immunol.* 6 (12): 930-9.
- (7) ALCAMI, J.; JOSEPH MUNNE, J.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A. Y ESTEBAN, M. (2005) Current situation in the development of a preventive HIV vaccine. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 23 (Supl. 2): 15-24.
- (8) GONZALO, R.M.; RODRIGUEZ, J.R.; RODRIGUEZ, D.; GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G.; LARRAGA, V. AND ESTEBAN, M. (2001) Protective immune response against cutaneous leishmaniasis by prime/booster immunization regimens with vaccinia virus recombinants expressing *Leishmania infantum* p36/LACK and IL-12 in combination with purified p36. *Microbes Infect.* 3 (9): 701-11.
- (9) MOSS, B. (1996) Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93 (21): 11341-8.
- (10) STAIB, C.; DREXLER, I. AND SUTTER, G. (2004) Construction and isolation of recombinant MVA. *Methods Mol. Biol.* 269: 77-100.
- (11) PASTORET, P.P. AND VANDERPLASSCHEN, A. (2003) Poxviruses as vaccine vectors. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 26 (5-6): 343-55.
- (12) MAYR, A.; STICKL, H.; MULLER, H.K.; DANNER, K. AND SINGER, H. (1978) [The smallpox vaccination strain MVA: marker, genetic structure, experience gained with the parenteral vaccination and behavior in organisms with a debilitated defence mechanism (author's transl)]. *Zentralbl. Bakteriol. [B]*. 167 (5-6): 375-90.
- (13) SUTTER, G. AND STAIB, C. (2003) Vaccinia vectors as candidate vaccines: the development of modified vaccinia virus Ankara for antigen delivery. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* 3 (3): 263-71.
- (14) LI, S.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, J.R.; ESTEBAN, M.; PALESE, P. ET AL. (1994) Priming with recombinant influenza virus followed by administration of recombinant vaccinia virus induces CD8+ T-cell-mediated protective immunity against malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90 (11): 5214-8.
- (15) RODRIGUES, M.; LI, S.; MURATA, K.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; BACIK, I. ET AL. (1994) Influenza and vaccinia viruses expressing malaria CD8+ T and B cell epitopes. Comparison of their immunogenicity and capacity to induce protective immunity. *J. Immunol.* 153 (10): 4636-48.
- (16) MIYAHIRA, Y.; GARCIA-SASTRE, A.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; MURATA, K.; TSUJI, M. ET AL. (1998) Recombinant viruses expressing a human malaria antigen can elicit potentially protective immune CD8+ responses in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 (7): 3954-9.
- (17) ZAVALA, F.; RODRIGUES, M.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; NUSSENZWEIG, R.S. AND ESTEBAN, M. (2001) A striking property of recombinant poxviruses: efficient inducers of in vivo expansion of primed CD8(+) T cells. *Virology.* 280 (2): 155-9.
- (18) GHERARDI, M.M.; PEREZ-JIMENEZ, E.; NAJERA, J.L. AND ESTEBAN M. (2004) Induction of HIV immunity in the genital tract after intranasal delivery of a MVA vector: enhanced immunogenicity after DNA prime-modified vaccinia virus Ankara boost immunization schedule. *J. Immunol.* 172 (10): 6209-20.

- (19) TARTAGLIA, J.; PERKUS, M.E.; TAYLOR, J.; NORTON, E.K.; AUDONNET, J.C.; COX, W.I. ET AL. (1992) NYVAC: a highly attenuated strain of vaccinia virus. *Virology*. 188 (1): 217-32.
- (20) NAJERA, J.L.; GOMEZ, C.E.; DOMINGO-GIL, E.; GHERARDI, M.M. AND ESTEBAN, M. (2006) Cellular and biochemical differences between two attenuated poxvirus vaccine candidates (MVA and NYVAC) and role of the C7L gene. *J. Virol.* 80 (12): 6033-47.
- (21) GALLEGO-GOMEZ, J.C.; RISCO, C.; RODRIGUEZ, D.; CABEZAS, P.; GUERRA, S.; CARRAS-COSA, J.L. ET AL. (2003) Differences in virus-induced cell morphology and in virus maturation between MVA and other strains (WR, Ankara, and NYCBH) of vaccinia virus in infected human cells. *J. Virol.* 77 (19): 10606-22.
- (22) GUERRA, S.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; CONDE, R.; PASCUAL-MONTANO, A.; HARSHMAN, K. AND ESTEBAN, M. (2004) Microarray analysis reveals characteristic changes of host cell gene expression in response to attenuated modified vaccinia virus Ankara infection of human HeLa cells. *J. Virol.* 78 (11): 5820-34.
- (23) GUERRA, S.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; PASCUAL-MONTANO, A.; MUNOZ, M.; HARSHMAN, K. AND ESTEBAN, M. (2003) Cellular gene expression survey of vaccinia virus infection of human HeLa cells. *J. Virol.* 77 (11): 6493-506.
- (24) GUERRA, S.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; PASCUAL-MONTANO, A.; NAJERA, J.L.; ZABALLOS, A. AND ESTEBAN, M. (2006) Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF-kappaB-responsive genes in infected HeLa cells. *J. Virol.* 80 (2): 985-98.
- (25) GUERRA, S.; NAJERA, J.L.; GONZALEZ, J.M.; LOPEZ-FERNANDEZ, L.A.; CLIMENT, N.; GATELL, J.M. ET AL. (2007) Distinct gene expression profiling after infection of immature human monocyte-derived dendritic cells by the attenuated poxvirus vectors MVA and NYVAC. *J. Virol.* 81 (16): 8707-21.
- (26) MESCHER, M.F.; AGARWAL, P.; CASEY, K.A.; HAMMERBECK, C.D.; XIAO, Z. AND CURTSINGER, J.M. (2007) Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation. *Semin. Immunol.* 19 (3): 153-61.
- (27) MESCHER, M.F.; CURTSINGER, J.M.; AGARWAL, P.; CASEY, K.A.; GERNER, M.; HAMMERBECK, C.D. ET AL. (2006) Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunol. Rev.* 211: 81-92.
- (28) LU, B. (2006) The molecular mechanisms that control function and death of effector CD4+ T cells. *Immunol. Res.* 36 (1-3): 275-82.
- (29) SUNDRUD, M.S. AND RAO, A. (2007) New twists of T cell fate: control of T cell activation and tolerance by TGF-beta and NFAT. *Curr. Opin. Immunol.* 19 (3): 287-93.
- (30) ANEL, A.; BOSQUE, A.; NAVAL, J.; PINEIRO, A.; LARRAD, L.; ALAVA, M.A. ET AL. (2007) Apo2L/TRAIL and immune regulation. *Front. Biosci.* 12:2074-84.
- (31) GOMEZ, C.E.; NAJERA, J.L.; JIMENEZ, E.P.; JIMENEZ, V.; WAGNER, R.; GRAF, M. ET AL. (2006) Head-to-head comparison on the immunogenicity of two HIV/AIDS vaccine candidates based on the attenuated poxvirus strains MVA and NYVAC co-expressing in a single locus the HIV-1(BX08) gp120 and HIV-1(IIIB) Gag-Pol-Nef proteins of clade B. *Vaccine.* 25 (15): 2863-85.
- (32) GOMEZ, C.E.; NAJERA, J.L.; JIMENEZ, V.; BIELER, K.; WILD, J.; KOSTIC, L.; ET AL. (2007) Generation and immunogenicity of novel HIV/AIDS vaccine candida-

- tes targeting HIV-1 Env/Gag-Pol-Nef antigens of clade C. *Vaccine*. 25 (11): 1969-92.
- (33) ZHOU, T.; XU, L.; DEY, B.; HESSELL, A.J.; VAN RYK, D.; XIANG, S.H. ET AL. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*. 445 (7129): 732-7.
- (34) Gherardi, M.M. and Esteban, M. (2005) Recombinant poxviruses as mucosal vaccine vectors. *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 11): 2925-36.
- (35) ABAITUA, F.; RODRIGUEZ, J.R.; GARZON, A.; RODRIGUEZ, D. AND ESTEBAN, M. (2006) Improving recombinant MVA immune responses: potentiation of the immune responses to HIV-1 with MVA and DNA vectors expressing Env and the cytokines IL-12 and IFN-gamma. *Virus Res.* 116 (1-2): 11-20.
- (36) GHERARDI, M.M.; RAMIREZ, J.C. AND ESTEBAN, M. (2003) IL-12 and IL-18 act in synergy to clear vaccinia virus infection: involvement of innate and adaptive components of the immune system. *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 8): 1961-72.
- (37) GHERARDI, M.M.; RAMIREZ, J.C.; RODRIGUEZ, D.; RODRIGUEZ, J.R.; SANO, G.; ZAVALLA, F. ET AL. (1999) IL-12 delivery from recombinant vaccinia virus attenuates the vector and enhances the cellular immune response against HIV-1 Env in a dose-dependent manner. *J. Immunol.* 162 (11): 6724-33.