

# Estado actual de las vacunas experimentales VIH/SIDA

**SILVIO ARANGO-JARAMILLO, DVM, MSC, PHD.**

Departamento de Microbiología Molecular e Inmunología.

Universidad de Johns Hopkins, Baltimore, Maryland, U.S.A.

La Organización de Naciones Unidas (ONU) estima que en este año de 1998, unas 16.000 personas se infectarán diariamente con el VIH, para un número global de 5.8 millones en los doce meses. Así mismo, 90% de dichas infecciones ocurrirán en los países en vía de desarrollo, en donde a la larga la gran mayoría morirán de SIDA o infecciones oportunistas. El estimativo para el final de la década o paso al nuevo milenio, es de 40 millones de personas muertas por este flagelo, dejando más de 9 millones de huérfanos. Debido a que muchos de estos países no pueden sufragar el costo de los nuevos medicamentos antirretrovirales, el cual fluctúa entre 12 mil y 15 mil dólares por paciente por año, la única medida de salud pública disponible en estos casos es la consejería hacia el cambio de patrones de comportamiento de alto riesgo para la adquisición de la infección. Es por esto que la comunidad científica ha incrementado su actividad en el campo del desarrollo de vacunas, durante los últimos años. De esto surgió la iniciativa internacional para la vacuna del SIDA (IAVI), coordinada por la Fundación Rockefeller, y la designación por parte de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH), del premio Nobel, David Baltimore, para encabezar un comité cuyo objetivo es el desarrollo de una vacuna eficaz.

La idea principal de esta presentación es hacer una síntesis de los desarrollos más recientes en el campo de las vacunas experimentales contra el VIH-1 en términos generales. Al comienzo me referiré a algunos aspectos básicos de inmunología, virología y biología molecular de manera muy breve y sucinta, con el objeto de establecer claridad en cuanto a los diversos tipos de vacunas y cómo los inmunógenos pueden iniciar o desencadenar la respuesta inmunológica. Se trata por consiguiente de un pequeño repaso a algunos puntos claves de ciencias básicas que están estrechamente ligados a los aspectos clínicos y epidemiológicos, por cuanto permiten establecer diferencias de criterio con base científica y no meramente empírica, con respecto a las diferentes vacunas.

Las células B o linfocitos B, precursores de las células plasmáticas o plasmocitos o células secretoras de anticuerpos, reconocen antígenos o inmunógenos tales como proteínas, péptidos, carbohidratos o grupos químicos simples, a través de moléculas de inmunoglobulinas receptoras, presentes en la superficie de tales linfocitos B. Luego del contacto con el inmunógeno, se expanden clonalmente y posteriormente se convierten en plasmocitos, los cuales secretan las inmunoglobulinas o anticuerpos.

En contraste, para que un antígeno o inmunógeno pueda ser reconocido por las células T, éstos deben ser presentados sobre la superficie de células presentadoras de antígenos (APCs),

en unión o combinación con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), bien sea de clase I o II. Luego los clones de células T, los cuales portan el receptor de células T (TCR), son estimulados por los antígenos para proliferar y convertirse en células efectoras de la inmunidad de base celular. Como sabemos, las dos principales subpoblaciones de células T son las T ayudadoras o Th o CD4+, y las células T citotóxicas o Tc o CD8+.

Las células CD8+, son muy importantes en la actividad citolítica o CTL, y en general pueden responder a antígenos cuando éstos son presentados en combinación con una molécula de clase I MHC, o sea de aquellos antígenos de histocompatibilidad tales como los HLA-A, B y C. Las células CD4+ por su parte casi que sólo reconocen antígenos o inmunógenos en el contexto o combinación con moléculas MHC de clase II, o sea aquellos antígenos de histocompatibilidad como los HLA-D, DR, etc.

### **Proceso y presentación de antígenos en el contexto de MHC clase II**

Aquellos antígenos exógenos extracelulares nativos, ingresan a la célula procesadora y presentadora de antígenos APC, bien sea por endocitosis mediada por receptores en unas vesículas recubiertas de clatrina, o también por pinocitosis. Estos antígenos internalizados se localizan en endosomas tempranos y luego van a endosomas tardíos, en donde son procesados por enzimas proteolíticas y catalíticas originadas en compartimientos del lisosoma. La ruptura de estas proteínas nativas o inmunógenos resulta en una serie de pequeños fragmentos peptídicos, los cuales posteriormente se adhieren a las moléculas clase II sintetizadas en el retículo endoplásmico. Luego, al formarse estos complejos, son transportados hasta el aparato de Golgi. Las vesículas que contienen complejos con moléculas clase II se fusionan con vesículas endosómicas, en donde ellas encuentran los fragmentos proteicos generados del proceso de péptidos exógenos. El pH ácido y las enzimas proteolíticas en el compartimiento endosómico, promueven la disociación permitiendo a los antígenos procesados adherirse en un complejo estable con las moléculas clase II. Estos complejos son entonces transportados dentro del endosoma hacia la superficie de la célula y quedan por tanto a disposición para el reconocimiento por parte del TCR o receptor de las células T.

Esta vía metabólica de procesamiento de antígenos exógenos o externos en el contexto de moléculas MHC clase II, se conoce como la vía endosómica o endocítica o exógena y es característica de las vacunas con base en antígenos o inmunógenos que no pueden replicarse, tales como proteínas de la estructura del virus o viriones completos inactivados o muertos. Al no presentar los antígenos a las células T en el contexto de clase I, generalmente no pueden estimular a las células T CD8+ o citotóxicas, y por consiguiente no provocan respuesta de CD8+ CTL tan codiciada por los investigadores en el área de vacunas. Esto es debido a que los CD8+ casi que sólo reconocen antígenos presentados a ellos en el contexto o en combinación con moléculas MHC clase I. Estadísticamente hablando habría un mínimo porcentaje de CD8 que podrían salirse de este esquema, pero en términos globales la mayoría de estos linfocitos se comportan como interactuantes con las moléculas Clase I.

## **Proceso y presentación de antígenos en el contexto de MHC clase I**

En contraste, aquellos antígenos o inmunógenos o péptidos sintetizados intracelularmente, o sea producidos por la propia célula, son degradados hasta pequeños fragmentos por intermedio de proteosomas, los cuales son luego transferidos a través de la membrana del retículo endoplásmico por unas proteínas especializadas denominadas TAP 1 y TAP 2. Dentro del lumen del retículo endoplásmico, los fragmentos del antígeno se unen a moléculas clase I recién sintetizadas, estabilizando la asociación con las cadenas de beta-2-microglobulina, para formar un complejo triple que es a su vez transportado al aparato de Golgi y posteriormente a la superficie de la célula, en donde quedan los péptidos antigénicos a disposición para reconocimiento por parte del receptor de células T (TCR).

Esta última vía metabólica de ingreso y procesamiento de antígenos es conocida como la vía citosólica o endógena y es característica de la utilizada por vacunas vivas replicativas o aquellas recombinantes en vectores vivos. Como los antígenos en este caso son sintetizados dentro de la célula infectada, se presentan procesados a las células T CD8+ en combinación con moléculas MHC clase I y por consiguiente tienen gran opción para desencadenar respuestas inmunitarias celulares de tipo CD8+ CTL o lítica, considerada como una de las más efectivas que pudiera lograr una vacuna.

Debemos recordar que las vacunas se evalúan epidemiológicamente a través de lo que se denomina fases I, II, III y IV, en donde la fase I comprende estudios de inocuidad o seguridad, los cuales se llevan a cabo usualmente en grupos muy pequeños de personas voluntarias, con un número de muestra n muy bajo (n=10-60).

En la fase II, los estudios de inocuidad e inmunogenicidad se amplían y se analizan características como transmisibilidad y estabilidad genética, en una muestra poblacional a riesgo de contraer la infección, llegando el n a ser cercano a 1000. La fase III o de medición de la eficacia protectora, es un ensayo de campo en una amplia muestra poblacional a riesgo, en donde el n puede alcanzar 100.000 o más. La fase IV es una aplicación a gran escala del experimento con la vacuna a probar, con números n superiores a 100.000.

## **Principales problemas relacionados con el desarrollo de vacunas VIH/SIDA**

1. La gran variabilidad genética del virus y la alta frecuencia de recombinación y de mutación. El VIH-1 se clasifica en dos grupos: M y O. El grupo M o mayor y el grupo O u Outgroup. La ciclofilina A se requiere para la replicación del Grupo M y para el VIS (virus de inmunodeficiencia de los simios) pero no para el grupo O u otros virus de inmunodeficiencia de primates. El M está compuesto por lo menos de 8 subgrupos o clades, designados desde la A---->H, con base en la homología de secuencias del gen env. Hay mucha menor diversidad genética entre las proteínas internas del virión y los productos de otros genes virales.

La variación ocurre con mayor énfasis en la gp120, en donde están localizados epítopes neutralizantes mayores y algunos para actividad citotóxica de células T (CTL). Así que

virus transmitidos por personas infectadas, pueden ser resistentes a neutralización (NT) o actividad CTL conferida por inmunización o virus resistentes pueden emerger después de la infección.

2. El virus ataca células claves de la maquinaria inmunológica. El VIH prefiere las células CD4+ o células T ayudadoras, las cuales son clave en la respuesta inmunitaria.
3. No se conocen los correlatos de inmunidad protectora. Un serio problema para la evaluación de la eficacia de una vacuna en esta área, es el no contar con una prueba de laboratorio cuyo resultado correlacione con protección contra el VIH. No se dispone de tales herramientas y por tanto es muy difícil definir si se logra o no protección contra la infección o contra el avance de la misma hacia SIDA. Nuestro grupo de investigación acá en la Universidad de Johns Hopkins, encabezado por el Doctor David H. Schwartz, ha venido proponiendo un sistema sencillo y directo de infección y descarga o reto viral *in vitro*, utilizando CSMPs, como herramienta que defina según la susceptibilidad o la resistencia, la falta de inmunidad o bien la protección, respectivamente.
4. La inmunización con glicoproteínas de la envoltura podría inducir autoanticuerpos capaces de inhibir la función inmunitaria o podría provocar la formación de CTL autorreactivas produciendo la destrucción de las células CD4. Por ser un virus con envoltura, la cual adquiere principalmente al salir de la célula que infecta, este virión tiene la propiedad de poseer en dicha envoltura muchas de las proteínas que hacen parte de la membrana celular de los humanos, varias de ellas de las derivadas del complejo mayor de histocompatibilidad MHC, de clase I y II.
5. La estimulación de las células del sistema inmunitario o maquinaria inmunológica puede ser un factor predisponente para activar la replicación del VIH. Así que el uso de inmunización en personas infectadas con el VIH podría ser riesgoso desde este punto de vista.
6. Experimentos *in vitro* han sugerido la posibilidad de la provocación de una débil respuesta de anticuerpos neutralizantes o respuesta subneutralizante, lo cual podría acrecentar la susceptibilidad de la persona a la infección por este virus.
7. La falta de modelos animales lo suficientemente adecuados. Varios estudios en chimpancés y macacos han producido resultados conflictivos. Chimpancés, mandriles y gibones, son muy costosos y se consideran como en vía de extinción. Además estos animales pueden ser infectados con el VIH-1, pero dicha infección no conlleva a SIDA o algo similar. Monos de la especie *Macaca nemistrina*, los cuales son más fáciles de conseguir y de menor costo, pueden ser infectados también si se administra un fuerte inóculo, pero usualmente la replicación viral en ellos es marcadamente limitada.

Varias cepas del virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS) infectan macacos y producen en ellos una enfermedad que se parece al SIDA de los humanos. Sin embargo, este virus VIS difiere biológicamente del VIH-1 en varios aspectos. Es diferente

antigénicamente y su “loop” V3 de la región *env* es altamente conservada. Cepas linfotrópicas de este virus no parecen inducir la producción de anticuerpos neutralizantes. *Macacus rhesus* y *nemistrina* pueden ser infectados también por el VIH-2, pero se replica muy pobremente y no produce enfermedad. Se han utilizado también virus construidos en el laboratorio los cuales son realmente quimeras entre VIS y VIH-1 (SVIH) o entre VIH-1 y VIH-2.

8. Durante la replicación viral, la infección latente se puede establecer por integración del DNA viral en el genoma de la célula.
9. Se ha observado frecuentemente un progreso de la infección hacia el estado clínico de enfermedad, a pesar de una vigorosa respuesta inmunitaria, por ejemplo con altos niveles de anticuerpos.
10. La transmisión *in vivo* puede efectuarse por medio de la fusión celular o también por la acción del virus libre circulante.
11. Factores éticos.
12. Factores sociopolíticos.
13. Factores económicos, incluyendo aspectos de producción y mercadeo.
14. Factores logísticos.
15. Otros factores.

### **Metas de una vacuna VIH/SIDA**

1. Muchos consideran que no es muy factible a corto plazo lograr una vacuna que confiera lo que se denomina inmunidad esterilizante, o sea una sólida protección contra la infección con la destrucción en la práctica del virus invasor. Pero sí opinan que un alcance realístico sería proveer una inmunidad suficiente para restringir la replicación viral y destruir viriones presentes en los fluidos orgánicos y en las células que viajan en ellos y que permita el establecimiento de memoria inmunológica que pueda ser estimulada de manera anamnésica durante la exposición o re-exposición al virus. Hay una tendencia a incrementar la evidencia de bajos niveles de virus en plasmas, células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSPs) y células mononucleares de los nódulos linfáticos, en personas VIH positivas de las denominadas sobrevivientes de largo período. Estudios realizados en el área de la transmisión del VIH de la madre al infante sugieren que la carga viral por encima de las 100.000 copias de RNA viral por ml en el plasma materno, presenta un 75% de probabilidad de transmitir el virus al niño, frente a un riesgo del 3% para aquellas madres con cargas virales por debajo de ese nivel. De ahí que es concebible el desarrollo de una vacuna parcialmente efectiva, la cual pueda beneficiar la población a riesgo, si las personas vacunadas que resulten infectadas pueden mantener, gracias a esa

vacuna, niveles de viremia por debajo de los requeridos para la transmisión del virus y para el progreso hacia SIDA. También está siendo considerada la posibilidad de lograr una mayor reducción de la carga viral en personas infectadas que reciban esta vacuna de efectividad parcial y de sus contactos, mediante la combinación de tratamientos con medicamentos antirretrovirales.

### **Estrategias de inmunización**

1. Inmunización preventiva o profiláctica: Diseñada para personas no infectadas, tratando de prevenir la infección o restringir la replicación viral, resultando la posibilidad de reducir la transmisión y retardar el progreso hacia SIDA.
2. Inmunización postexposición o inmunoterapéutica: Con el objeto de incrementar y ensanchar la respuesta inmunitaria de base humoral y celular para restringir la replicación viral, reducir la transmisibilidad y demorar el progreso hacia el SIDA.
3. Inmunización perinatal: Vacunación de mujeres infectadas antes o durante el embarazo para incrementar la respuesta inmunitaria, restringir la replicación viral y reducir la transmisión al infante por vía intrauterina y durante el período postnatal.
4. Inmunización pasiva: Administración de inmunoglobulinas o de anticuerpos monoclonales a embarazadas, para prevenir la transmisión de la infección al infante. También podría utilizarse en recién nacidos y en personas expuestas al VIH-1, con el objeto de prevenir la infección y restringir la replicación viral.

### **Marcadores y correlatos de protección**

Prácticamente no se dispone de marcadores que indiquen protección o de correlatos de la misma. Se estima, sin embargo, que una vacuna efectiva debería inducir una sólida inmunidad de base celular representada primordialmente por actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) y quizás de inducción de anticuerpos neutralizantes. Nuestro grupo está trabajando desde hace algún tiempo, entre otros, con el objetivo de obtener dicho correlato, utilizando un sistema *in vitro* de infección-descarga o reto con el virus en CMSPs.

Una de las maneras de enfocar el estudio de este tópico ha sido la observación detallada de la respuesta inmunitaria en personas infectadas que han sobrevivido sin evolucionar hacia SIDA por un largo período (usualmente varios años). Otra manera de mirar esta problemática, ha sido el estudio de macacos sobrevivientes al virus de la inmunodeficiencia de los simios (VIS) y los ensayos de vacunas experimentales en modelos animales que se puedan asemejar en alguna forma al problema en humanos, seguidos por retos o descargas de virus vivo (particularmente macacos y chimpancés). Pero estos resultados han sido contradictorios en diferentes experimentos, provocando conclusiones conflictivas.

## **Inmunidad humoral**

Se conoce bastante sobre los anticuerpos neutralizantes contra cada uno de los dos principales dominios, llamados por lo tanto principales dominios neutralizantes, a saber: el loop V3 y el sitio de unión con la molécula receptora CD4 de la gp120. La alta mutabilidad de la región gp120 con cambios en la secuencia de aminoácidos de la región del V3 loop, podría permitir al virus evadir los anticuerpos neutralizantes tipo específico inducidos por la inmunización. Epítopes lineales cortos en la punta o cumbre del loop V3 y otros estructural-dependientes en la gp120, son conservados y estimulan la producción de una amplia gama de anticuerpos contra diversos aislados, en líneas celulares de origen humano.

Aquellos virus cuyo pasaje se lleva a cabo en líneas celulares T, difieren biológicamente de aquellos en CMSPs. Los de líneas celulares son más sensibles a la neutralización por suero de infectados o vacunados, mientras que la mayoría de los aislados primarios en CMSPs son mucho más difíciles de neutralizar. La diferencia no parece deberse a un déficit cuantitativo de la producción de anticuerpos contra env, ya que altas concentraciones de suero inmune no han sido capaces de neutralizar aislados primarios. La diferencia en neutralización entre aislados primarios y cepas mantenidas en cultivos celulares, podría atribuirse a diferencias en los niveles de glicosilación de la gp120 y la gp41, lo cual a su vez podría afectar la conformación global de la proteína y por consiguiente la accesibilidad de los diferentes epítopes a los anticuerpos neutralizantes.

Sueros inmunes provenientes de personas vacunadas con env, se unen a péptidos lineales y a epítopes accesibles dentro de la molécula monomérica de gp120 que ha sido reducida y carboximetilada y no se une a las moléculas gp120 estructuralmente intactas, o sea aquellas que se adhieren a los CD4.

Evidencia de protección inducida por anticuerpos contra la infección o la enfermedad procede exclusivamente de experimentos con números bajos de chimpancés, a reto con VIH-1, luego de vacunación experimental, o de estudios similares con macacos y VIS.

## **Inmunidad celular**

Respuesta de células T: Se requieren células  $T_h$  para la producción de anticuerpos y activación de la respuesta de CTLs. Las células T CD8<sup>+</sup> pueden destruir células infectadas mediante diversos mecanismos, incluyendo la citolisis. Parece que además estas últimas células pueden suprimir la replicación de algunas cepas del VIH-1 a través de la liberación de quimiocinas tales como RANTES, MIP-1 alfa y MIP-1 beta, o bien de la IL-16.

Varios epítopes de células T, incluyendo algunos capaces de inducir actividad CTL, residen en las regiones conservadas de productos génicos de gp120, gp41, *gag*, *nef* y polimerasa y dentro de la región hipervariables del loop V3 de la gp120. Para inducir actividad citotóxica, los antígenos virales deben ser procesados apropiadamente a través de la vía metabólica endógena y presentados en el contexto de MHC clase I.

Cada vez se consolida más la idea de que la actividad CTL de los CD8+ contribuye al mantenimiento del período asintomático por largos períodos, mediante la destrucción de células infectadas y la modulación negativa de la replicación viral. Al igual que en el caso de los anticuerpos neutralizantes, la efectividad del sistema inmunitario puede deteriorarse o disminuirse por alteraciones en epítopes CTL en virus mutantes y por la inhabilidad de las CTL para reconocer células CD4 +, células dendríticas foliculares, células epiteliales y macrófagos que albergan virus latente durante las infecciones crónicas.

La evidencia de protección asociada con actividad CTL se ha venido sumando a lo largo de varios estudios. Resultados de trabajos en Gambia sugieren que personas altamente expuestas al VIH-1, las cuales presentan CD8+ CTLs específicos para este virus, en ausencia de anticuerpos, parecen estar protegidas contra la infección. Algunos infectados presentan precursores de CTLs coincidiendo con desaparición del VIH-1 antes de la posibilidad de encontrar anticuerpos neutralizantes. Actividad de CTL ha sido también informada en algunos infantes no infectados nacidos de VIH positivas, al igual que en algunos adultos seronegativos con frecuente exposición al VIH-1 por la vía sexual. Algunos estudios sugieren que la actividad de CTL, especialmente la específica para derivados del gen *gag*, podría limitar la expansión del virus y demorar el comienzo de la enfermedad.

Los CTLs específicos para VIH-1 pueden a su vez tener efectos negativos colaborando con el proceso de patogenicidad. Siliciano *et al*, encontraron que CD4+ CTLs específicos para gp120 pueden destruir células CD4+ autólogas altamente activadas, las cuales han tomado y procesado la gp120, sea que estos CD4 hayan sido infectados o no por el virus. La eliminación de esas células puede causar deterioro del sistema y de la respuesta inmunitaria. Experimentos *in vitro* han demostrado que clones de CD4+ CTLs inducidos por gp 160 recombinante, pueden producir citocinas tales como el factor alfa de necrosis tumoral, el cual puede incrementar la expresión de genes del VIH-1. Por lo tanto una vacuna segura deberá excluir aquellos epítopes celulares T que causen daño a células espectadoras inocentes que simplemente se encuentran en la vecindad, o que incrementen la replicación del virus o la inmunosupresión.

## **Inmunógenos del VIH-1**

### ***Glicoproteínas de la envoltura del virión (ENV)***

Principalmente gp120, su loop V3 o la gp 160 han sido las proteínas de envoltura más comúnmente utilizadas como inmunógenos en las primeras vacunas experimentales contra el VIH-1. Se consideran importantes por el hecho de contener varios epítopes funcionales de células T y B, incluyendo al menos cinco dominios neutralizantes y otros para actividad CTL o de citotoxicidad mediada por células pero dependiente de anticuerpos (ADCC). Las glicoproteínas de envoltura también pueden contener epítopes potencialmente indeseables, tales como el supresor de células T, reconocido por las personas infectadas, en la gp41 y los anticuerpos acrecentadores dependientes a su vez de anticuerpos (ADE).

### ***Proteínas internas del virión***

Productos del gen gag, los cuales contienen secuencias de aminoácidos altamente conservadas o de poquísima variabilidad, contienen epítopes reconocidos por T<sub>h</sub> y CD8<sup>+</sup> CTLs. Epítopes para CTL están también localizados dentro de dominios relativamente conservados de productos de otros genes del VIH-1, tales como aquellos codificados por los genes nef y el de la polimerasa pol. Cerca de 70 a 85% de las personas infectadas con el VIH-1 presentan anticuerpos anti-proteína nef, pero no se conoce el papel de ellos en el control de la infección.

### **Estudios de la eficacia de vacunas anti VIH-1 en chimpancés**

Estas determinaciones de seguridad, toxicidad e inmunogenicidad de vacunas experimentales en modelos animales deben ser extrapoladas a humanos con muchísima precaución ya que no se dispone de un modelo animal lo suficientemente confiable para ello.

Varias vacunas con subunidades del env han mostrado conferir protección en chimpancés, pero también vacunas compuestas por VIH-1 inactivado o con proteínas recombinantes en un vector de virus vaccinia o de virus de la viruela de canario, con o sin refuerzos posteriores, con regiones del “loop” V3 de la gp120, han fallado en la inducción de inmunidad protectora ante la descarga o reto con cepas cultivadas *in vitro* tales como IIB y SF-2. En macacos se han ensayado vacunas con base en VIS inactivado, cultivado en células T humanas, confiriendo protección contra la descarga con VIS. Sin embargo, estos resultados no son muy confiables por cuanto los controles también provocaron protección parcial.

### **Evaluación clínica de vacunas experimentales preventivas anti VIH-1**

Ensayos en fase I o en fases I y II para inmunógenos candidatos para convertirse en vacunas anti VIH-1 han sido conducidos en personas voluntarias no infectadas en los Estados Unidos, el Reino Unido, Francia, Suiza, Australia, Japón, China, Tailandia y Brasil. Desde 1988, los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (NIH), a través de los Institutos Nacionales de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) han mantenido una red de unidades de evaluación de vacunas en varias instituciones académicas, con el fin de evaluar la inocuidad o seguridad y la inmunogenicidad de vacunas experimentales en las fases I y II. Así mismo la red ha contado con la participación de una corporación que provee servicios de manejo de datos. Toda la red del NIH para estos fines es conocida como el Grupo de Evaluación de Vacunas contra el SIDA o AIDS Vaccine Evaluation Group (AVEG). Este grupo ha iniciado 17 ensayos de inocuidad e inmunogenicidad para 17 vacunas experimentales contra el VIH-1, incluyendo 10 adyuvantes. Estos estudios se han llevado a cabo con la colaboración de un número superior a 1.800 personas voluntarias seronegativas.

Los inmunógenos probados inicialmente fueron derivados de la cepa III<sub>B</sub>, también conocida como HTLVIII<sub>B</sub> o HIV-1<sub>LAI,LAV</sub> o BRU y más tarde de la HIV-1<sub>MN</sub> o HIV-1<sub>SF-2</sub> las cuales están antigénicamente más cercanas o relacionadas con el subtipo o clase B, aislado más comúnmente de personas infectadas en los Estados Unidos y Europa. Una combinación de productos representantes de diferentes cepas del subtipo o clase B y péptidos del loop V3 que

representan cinco subtipos o clases del VIH-1, también han sido probadas. La mayoría de vacunas experimentales con base en subunidades o péptidos han incorporado al alumbre como adyuvante, el cual es el único de estos compuestos con licencia o autorización para su uso en los Estados Unidos.

Luego de las pruebas preclínicas se han realizado numerosas evaluaciones clínicas para determinar la seguridad o inocuidad y la inmunogenicidad de varias vacunas experimentales anti VIH-1 especialmente en personas voluntarias seronegativas. Usualmente estos ensayos han sido conducidos de manera controlada como estudios de doble ciego y con selección totalmente al azar, estadísticamente hablando. Los ensayos de fase I han sido llevados a cabo con pequeños números de personas, las cuales se encuentran a relativo, intermedio o bajo riesgo de adquirir la infección con este virus. Estos trabajos permiten determinar las concentraciones óptimas de los inmunógenos, el número de dosis, el esquema de inmunización, la ruta de administración, el tipo de adyuvante si es del caso, su tolerabilidad e inmunogenicidad y finalmente la duración de la respuesta inmunitaria.

Una vez que estas vacunas experimentales muestran su inocuidad e inmunogenicidad en los ensayos de fase I, se han adelantado los experimentos con un mayor número de personas voluntarias, incluyendo grupos de alto riesgo de adquisición de la infección, en lo que se denomina ensayos de fase II. Estos estudios permiten obtener información adicional acerca de la inocuidad y la inmunogenicidad de la vacuna. Fase I y fase II usualmente se desarrollan en pequeños grupos de personas procedentes de una población con alta incidencia de infección por el VIH-1, con el objeto de conducir futuros ensayos de fase III en poblaciones similares.

Los ensayos de fase III no se han iniciado por muchísimos motivos, entre otros por no conocerse los marcadores o los correlatos de inmunidad protectora. Por consiguiente los niveles de eficacia de la vacuna podrían basarse en varios puntos o logros finales tales como por ejemplo la reducción de la tasa de infección, la carga viral y la severidad de la enfermedad. Estos ensayos de fase III requieren un seguimiento a largo plazo de varios miles de personas voluntarias las cuales se encuentren en alto riesgo de adquirir la infección. El tamaño de la muestra dependerá de la incidencia de la infección en la población a estudiar, la duración del ensayo de campo, la tasa de agotamiento del número de participantes, etc. Ensayos de fase III adicionales se requerirán en el caso de evaluación de la misma vacuna en otro tipo de poblaciones, particularmente si las cepas prevalentes del virus o las rutas de transmisión son diferentes.

### **Adyuvantes bajo investigación clínica**

Aunque el alumbre es el único adyuvante con licencia para utilización en humanos en los Estados Unidos y por consiguiente el que se ha incorporado más frecuentemente en las vacunas experimentales, otros tantos compuestos han sido utilizados en diferentes ensayos de fase I o II. Para vacunas compuestas de subunidades gp120 de VIH-1<sub>SF-2</sub> o VIH-1<sub>MN</sub> en personas voluntarias seronegativas se han probado diferentes adyuvantes, incluyendo el alumbre, una emulsión de aceite microfluidizado en agua (MF59), o MF59 con tripéptido de muramil dipalmitodil fosfatidil etanolamina (MTP-PE), monofosforil lípido A (MPL) en

escualeno (SAF2) saponina (QS-21), o lípido A, liposoma, encapsulado MPL con hidróxido de aluminio. La mayoría de estos adyuvantes combinados con vacunas compuestas de subunidad gp120 del VIH-1<sub>MN</sub> o del VIH-1<sub>SF-2</sub>, no mostraron ventaja definitiva sobre el alumbre o MF-59 en términos de tolerabilidad y de habilidad para inducir una significativamente mayor respuesta de anticuerpos neutralizantes y CD8+ CTLs.

El MTP-PE y el MPL-SAF2 causaron reacciones severas, autolimitadas, locales o sistémicas más a menudo que otros adyuvantes. Vacunas de subunidad gp160 del VIH<sub>III B</sub> y del VIH-1<sub>MN</sub> combinadas con alumbre y deoxicolato, provocaron respuesta prolongada y fuerte de linfoproliferación específica para el gp160.

### **Reactogenicidad**

Personas clínicamente sanas y seronegativas para el VIH, fluctuando entre los 18 y los 60 años de edad, han venido participando en los ensayos de vacunas experimentales anti VIH-1 en el programa AVEG, siendo monitoreadas desde el punto de vista clínico y de laboratorio. Posibles reacciones locales y sistémicas a la vacuna experimental, son seguidas cuidadosamente durante la semana siguiente a la administración de la primera dosis. Usualmente, dos semanas después de la misma, se evalúan las funciones hematológica, hepática y renal, mediante pruebas convencionales de laboratorio. Luego se toman muestras sanguíneas consecutivamente por un largo período y con espacios relativamente cortos de dos a cuatro semanas por ejemplo, con el fin de determinar la respuesta linfoproliferativa a antígenos clásicos de recuerdo o memoria inmunológica duradera como el toxoide tetánico, la *Candida albicans*, etc., y a mitógenos típicos.

Las vacunas experimentales analizadas dentro de este programa AVEG y otros han sido notablemente bien toleradas. Las pocas reacciones adversas locales o sistémicas observadas, se han presentado solamente en aquellos casos de vacunas con adyuvantes a probar, particularmente el MTP-PE, el MPL-SAF2, el deoxicolato y las preparaciones acídicas de QS-21.

La vacunación por escarificación con gp160 de VIH-III B recombinante en un vector Vaccinia ha producido lesiones locales y linfadenitis regional en personas que no habían recibido vacuna contra la viruela. Dichas lesiones sin embargo fueron indistinguibles de las presentadas con controles que contenían sólo el virus vector de Vaccinia. Glicoproteína gp160 de VIH-1<sub>MN</sub> recombinante en vector vivo de virus de la viruela del canario, administrada a personas voluntarias en Francia y en los Estados Unidos, por vía intramuscular, ha causado mucho menos casos de reacciones indeseables locales o sistémicas que la vacuna VIH-1<sub>III B</sub> recombinante con vaccinia. Los recombinantes en viruela del canario, no son transmisibles ya que el virus no se replica en células humanas.

Los parámetros clínicos y de laboratorio utilizados durante la observación postvacunal evaluativa han permanecido normales a pesar de la sugerencia de actividad citolítica contra células CD4+ por parte de las glicoproteínas del env del VIH-1. De manera similar, existe la sugerencia de la liberación de citocinas que sobrerregulan la expresión génica del virus o

causan la unión de anticuerpos a las células CD4+, lo cual podría incrementar la susceptibilidad a la infección por el VIH y aumentar la replicación viral. Los números y porcentajes de células T, CD4 y CD8 de vacunados no infectados, han permanecido estables. La respuesta blastogénica de los linfocitos a antígenos de Tétanos y Cándida no ha sido disminuida.

Anticuerpos contra un epítoto HLA cadena pesada de clase I y anticuerpos dependientes de anticuerpos acrecentadores (ADE) han sido hallados en algunas de las personas receptoras de vacuna con base en gp160 expresada en un vector Baculovirus y con alumbre como adyuvante. No hay todavía evidencia concluyente de enfermedad causada por anticuerpos ADE inducidos por la vacuna o por otro tipo de anticuerpos provenientes de la vacunación. Existe mucho temor sobre la discriminación social que puedan sufrir las personas voluntarias no infectadas que participan en estos ensayos de las vacunas, por cuanto pueden presentar resultados positivos o intermedios en las pruebas rutinarias de determinación de anticuerpos anti VIH-1. Las pruebas que utilizan lisados de viriones completos que contienen por tanto gp41 pueden detectar más fácilmente anticuerpos contra vacunas que contienen gp160, que contra aquellas que contienen péptidos del loop V3 o gp120. Recientemente nuestro grupo publicó en la revista *Lancet* una extensa evaluación de laboratorio de una persona seronegativa pero con alto riesgo de adquirir la infección por el VIH-1. Dicha persona era receptora de vacuna experimental, y en su historia presentaba un resultado positivo por PCR, el cual finalmente resultó ser un típico caso falso positivo.

La mayoría de pruebas ELISA utilizan la extraordinariamente conservada secuencia presente en la gp41, denominado el epítoto AVERY, el cual es inmunodominante y por tanto casi todas las personas VIH-1 positivas producen anticuerpos que reaccionan con esta secuencia de aminoácidos. Lo anterior por consiguiente lleva a la conclusión de evitar la inclusión de este epítoto en las vacunas, con el fin de no confundir vacunados con infectados.

### **Inmunogenicidad de las vacunas**

Casi todas las vacunas experimentales administradas a personas seronegativas han provocado respuesta de anticuerpos séricos medibles en un sistema ELISA. Algunas veces se han producido anticuerpos en la saliva, fáciles de hallar por el mismo sistema. La reacción de linfoproliferación *in vitro* a diferentes antígenos específicos del VIH-1 ha sido también demostrada en la mayoría de las instancias. Respuestas máximas de anticuerpos neutralizantes se han logrado después de tres a cuatro inmunizaciones, siendo estos refuerzos administrados usualmente cada tres a seis meses. La mejor producción de anticuerpos neutralizantes se ha logrado en personas inoculadas dos veces con gp160 de VIH-1<sub>MN</sub> recombinante en un vector vivo de viruela del canario y con administración de dos refuerzos con gp120 de VIH-1<sub>SF-2</sub> con adyuvante MF-59. El último pico de estos anticuerpos neutralizantes obtenidos con esta última inmunización, muestra inclusive reacción cruzada contra otros subtipos o clases diferentes al B.

De otra parte, anticuerpos que bloquean la unión a CD4 y aquellos que median la respuesta de ADCC, se han observado más a menudo en personas receptoras de vacunas con base en

gp120 de VIH-1<sub>MN</sub> y SF-2 plenamente glicosiladas y en aquellas que recibieron gp160 de VIH-1<sub>MN</sub> en virus de viruela del canario, con refuerzos subsiguientes de gp120 de VIH-1<sub>SF-2</sub>.

Utilizando un sistema de neutralización *in vitro* luego de la doble estimulación de células mononucleares sanguíneas periféricas (CMSPs) con fitohemaglutinina (PHA) e interleukina 2 (IL-2), con un VIH-1 replicado en cultivos celulares a una alta tasa de multiplicidad para la infección, ninguno de los sueros postvacunales ha mostrado poder neutralizante sobre cepas de aislados primarios del virus. Sin embargo, Zolla-Pazner y colaboradores han podido demostrar la neutralización de al menos un aislado primario postinmunización, en algunos casos de personas inmunizadas con la vacuna gp120 de VIH-1<sub>MN</sub> en vector vivo de viruela del canario, seguida de refuerzos con VIH-1<sub>SF-2</sub> utilizando una versión modificada de la neutralización clásica.

Vacunas recombinantes de envoltura del VIH-1 han provocado respuesta CD4+ CTL, pero no se conoce su papel *in vivo*. Así mismo se han encontrado respuestas CD8+CTL *in vitro* en solamente un pequeño grupo de voluntarios vacunados con la gp160 de VIH-1<sub>MN</sub> recombinante, vehiculizada en vector vivo de viruela del canario, con o sin inmunizaciones de refuerzo con subunidades del env del VIH-1. Se ha observado algo similar en algunos de los receptores de vacuna recombinante gp160 de VIH-1<sub>III B</sub> en vector de virus Vaccinia, particularmente en los casos de personas no inmunizadas previamente contra la viruela. Ocasionalmente se ha encontrado también respuesta de CD8+ CTL en receptores de péptidos del loop V3 conjugados con un portador PPD, o en el caso de subunidades de gp120 de la VIH-1<sub>SF-2</sub> en MF-59 o p17 sintética.

Las vacunas con base en gp160 evaluadas por el AVEG han inducido menos frecuentemente anticuerpos neutralizantes homólogos y con más bajos títulos que aquellas con base en gp120. La gp120 de VIH-1<sub>SF-2</sub> no glicosilada y expresada en levaduras, conocida también como env 2,3, acompañada de MF-59 con o sin MTP-PE, produjo resultados contradictorios en dos estudios diferentes. La inmunización con recombinantes de productos génicos de VIH-1, expresados en vectores de Poxvirus (Vaccinia o bien Viruela del canario), produjo respuesta humoral y celular. Las dosis altas produjeron en general mejores resultados, principalmente desde el punto de vista de la sensibilización inicial para efectos de la respuesta anamnésica o de memoria en subsiguientes refuerzos.

Personas sensibilizadas con una dosis alta inicial de la vacuna recombinante gp160 VIH-1<sub>MN</sub> expresada en vector vivo de viruela del canario y reforzada con gp120 de VIH-1<sub>SF-2</sub>, indujo CD4+ y CD8+ CTLs más frecuentemente que otras y más altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra VIH-1<sub>MN</sub> y VIH-1<sub>SF-2</sub>. De otra parte, los ensayos con vacunas con base en péptidos no han logrado demostrar mayor inmunogenicidad en las diferentes pruebas evaluativas.

El programa AVEG ha conducido estudios de fase II con las vacunas de gp120 de VIH-1<sub>SF-2</sub> adicionada de MF-59 y aquella con base en gp120 del VIH-1<sub>MN</sub> con un adyuvante de tipo alumbre, en poblaciones tanto de bajo como de alto riesgo a contraer la infección. Los de alto riesgo incluyen personas que utilizan drogas inyectadas, homosexuales masculinos

involucrados en sexo sin protección, adultos jóvenes entre 18 y 28 años de edad infectados recientemente con algunas de las infecciones de transmisión sexual clásicas y parejas heterosexuales de una persona VIH-1 positiva. Los resultados muestran hasta ahora que estas vacunas han sido inocuas o seguras e inmunogénicas en los diferentes grupos poblacionales.

No es posible que se presente el caso de la adquisición de la infección, debida a la administración de estas vacunas experimentales hasta ahora evaluadas, pero tampoco es posible asegurar que los resultados de las fases I y II de estos ensayos evaluativos, puedan demostrar que estas vacunas han conferido protección inmunitaria que pueda alterar el curso de la infección.

Por esta razón, se aconseja a las personas participantes en estos ensayos evitar el sexo no protegido y todas aquellas circunstancias que puedan conducir a la exposición directa a la infección con este agente. A pesar de las advertencias, una pequeña proporción de voluntarios, incluyendo algunas personas que sostienen pertenecer al grupo de bajo riesgo, han resultado infectadas luego de involucrarse en comportamientos de alto riesgo. Hasta 1996 había 24 personas en estos ensayos evaluativos quienes habían pasado al grupo de los VIH-1 positivos, provenientes tanto de los grupos receptores de vacuna como de los placebos controles.

También se han adelantado evaluaciones de diversas vacunas experimentales administradas a personas ya infectadas o VIH-1 positivas, a manera de inmunoterapia activa, con el objeto de aumentar la respuesta inmunitaria, reducir la carga viral y prevenir o al menos retardar el progreso hacia el SIDA. Entre estas vacunas se encuentran las elaboradas con base en gp160 y gp120, p24 y p17, o gp160 VIH-1<sub>MN</sub> recombinante en vector vivo de viruela del canario, e incluso viriones completos del VIH-1 inactivados. Todas, menos la elaborada con base en viriones inactivados, muestran inocuidad o seguridad. Las más ampliamente estudiadas son la gp160 VIH-1<sub>III B</sub> expresada en Baculovirus y con un adyuvante de alumbre y la de viriones completos inactivados.

Con respecto a resultados de trabajos adelantados por nuestro grupo en la Universidad de Johns Hopkins, los cuales se presentaron en febrero/98, en la ciudad de Chicago, durante la Quinta Conferencia sobre Retrovirus e Infecciones Oportunistas, debemos indicar que el ensayo *in vitro* de infección o descarga viral, el cual había correlacionado con niveles de viremia y progreso hacia SIDA en VIH-1 positivos asintomáticos (publicado en el Journal of Infectious Diseases del pasado noviembre), también correlacionó con la actividad CTL en doce voluntarios vacunados con productos génicos de segmentos de gp120<sub>MN</sub>, gp41<sub>LAI</sub>, gag<sub>LAI</sub>, y proteasa<sub>LAI</sub> recombinados en un vector de virus vivo de la viruela del canario y otro grupo con productos del nef<sub>MN</sub> y el pol<sub>LAI</sub>, seguidos de un refuerzo con VIH-1<sub>SF-2</sub> rgp120. Estos resultados sugieren que vacunas basadas en virus trópicos para líneas de células T, que contengan productos génicos no solamente del env, sino también de otros genes como el gag, las cuales inducen actividad CTL, podrían conferir resistencia a un amplio espectro de virus VIH incluyendo a aquellos trópicos para macrófagos. Esto además refuerza el valor evaluativo de vacunas, que este ensayo *in vitro* pueda tener.

De otra parte, estamos preparando nuestra presentación en Ginebra, Suiza, en la XII Conferencia Internacional sobre SIDA, en julio del presente año, resultados en donde mostramos resistencia a la descarga con VIH-1, en este ensayo *in vitro*, utilizando CMSPs procedentes de personas del Senegal, en Africa, quienes son VIH-2 positivas.

### **Inmunización perinatal**

Aunque hay evidencia de transmisión del VIH-1 por vía intrauterina, también puede transmitirse durante el período periparto, cuando hay gran exposición a sangre materna y otros fluidos. Anticuerpos IgG pueden transferirse a través de la placenta en pequeñas cantidades, tan temprano como a la semana 17 de la gestación y luego en volúmenes mayores después de la semana 32. La inmunización de la madre y el recién nacido mediante una vacuna ofrecería algunas ventajas sobre la inmunización pasiva, con respecto al modo de administración, bajo costo y la posibilidad de inducción de inmunidad de células T y B en el feto, así como el refuerzo de la inmunidad materna.

Los datos de los estudios perinatales todavía no son muy concluyentes y aun contradictorios, pero sugieren que el paso tardío de anticuerpos a través de la placenta de madres VIH-1 positivas, parece estar asociado con disminución de la transmisión perinatal. Los riesgos teóricos de la inmunización perinatal, incluyen, daño placentario por complejos inmunes y reducción del flujo sanguíneo de madre a feto, así como también la inducción de tolerancia del recién nacido a antígenos del VIH, el desarrollo de anticuerpos antiidiotipo a gp160, conducente a autoinmunidad e interferencia con los receptores normales CD4, con alteración de la subpoblación de estos linfocitos en el infante. Se consideran también posibles, el acrecentamiento de la replicación viral en placenta y linfocitos de cordón umbilical, mediada por anticuerpos incrementadores, lo cual pudiera conducir a un aumento de la susceptibilidad del feto a la infección viral. También los antígenos del VIH que no producen respuesta inmunitaria que inhiba la replicación viral, podrían contribuir a daño tisular de mediación inmune y la supresión de la respuesta proliferativa mediada por anticuerpos específicos anti VIH-1 contra la región gp41, homóloga a ciertos fenotipos HLA-DR. Pero hasta ahora, ninguno de estos fenómenos se ha demostrado *in vivo* en el caso de este tipo de inmunización.

Ensayos con vacunas con base en gp120 de VIH-1<sub>MN</sub> y SF-2, expresadas en células animales ováricas (CHO) con un adyuvante de alumbre o MF-59, respectivamente, se han llevado a cabo en un pequeño número de embarazadas VIH-1 positivas. Todas las vacunas ensayadas en embarazadas, han sido bien toleradas por las receptoras y los recién nacidos. En este momento se adelanta por parte de un grupo en NIH, encabezado por la doctora Lauren Wood, un ensayo de vacuna experimental combinada con quimioterapia antirretroviral de alta actividad (HAART), incluyendo niños, pero aún no se conocen los resultados respectivos en forma total.

## Referencias

Arango-Jaramillo S., Castillo R.C., and Schwartz D.H. *HIV specific lymphoproliferative responses inversely correlating with In Vitro resistance in multiply exposed uninfected volunteer*. Abstract submitted to the 98<sup>th</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology. Atlanta. GA, May 17-21. 1998.

Bloom B.R., *The highest attainable Standard: Ethical Issues in AIDS Vaccines*. Science. Vol. 279. 9 Jan. 1998.

Castillo R.C., Arango-Jaramillo S., Humphrey W., Weinhold K. and Schwartz D.H. *Vaccine Induced CTL Activity Correlates With Resistant Phenotype in an In vitro Challenge System*. Abstract presented at the 5<sup>th</sup> Conference on Retroviruses and Opportunistic Infections. Chicago IL, USA. February 1-5. 1998.

Clements M.L., *Experimental HIV-1 Vaccines*. Chapter 46, 673-709. In the book *New Generation Vaccines*, 2<sup>nd</sup> edition, Levine *et al* editors, Marcel Dekker, New York. 1997.

Desrosiers R.C., *HIV with multiple gene deletions in a live attenuated vaccine for AIDS*. AIDS Research and Human Retroviruses. 8:411-421, 1992.

Plummer F.A., Kowke K., Nagelkerke N.J.D., *et al*. *Evidence of resistance to HIV among continuously exposed prostitutes in Nairobi, Kenya*. In: Program and Abstracts: IX International Conference on AIDS/IV STD World Congress. Berlin, London: Wellcome Foundation, 1993.

Ruprecht R.M., Baba T.W., Liska V., *et al*. *Attenuated simian immunodeficiency virus in macaque neonates*. AIDS Research and Human Retroviruses, 12:459-460, 1996.

Schwartz D.H., Castillo R.C., Arango-Jaramillo S., Kanki P. *Resistance to HIV-1 in vitro in HIV-2 positive patients from Senegal*. Abstract submitted for presentation at the 12th World AIDS Conference. Geneva, June 30- July 3, 1998.

Schwartz D.H., Laeyendecker O., Arango-Jaramillo S., Castillo R.C., and Reynolds M.J. *Extensive evaluation of a seronegative participant in an HIV-1 vaccine trial as a result of false positive PCR*. The Lancet. 350, July 26, 1997.

Schwartz D.H., Castillo R.C., Arango-Jaramillo S., Sharma U.K., Song H.F., and Sridharan G. *Chemokine-Independent In Vitro Resistance to Human Immunodeficiency Virus (HIV-1). Correlating with Low Viremia in Long-Term and Recently Infected HIV-1 Positive Persons*. Journal of Infectious Diseases. 176, November, 1997.

Schwartz D.H., Castillo R.C., Arango-Jaramillo S., Laeyendecker O., Ray S., Kokotou E. *In Vitro Resistance to HIV-1 and Nondirectional C2V3 Diversity as Markers of In Vivo Host*

*Resistance.* Abstract presented at the Meeting on Immune Function and Surrogate Markers: Setting the Goal Line. Hosted by the Institute of Human Virology. University of Maryland at Baltimore. Baltimore, January 9-11, 1998.

Siliciano R.F., Lawton T., Knall C., *et al.* *Analysis of host-virus interactions in AIDS with anti-gp120 T cell clones.* Effect of HIV sequence variation and mechanism for CD4 cell depletion. *Cell.* 54:561-575, 1988.

Zolla-Pazner S., Berman P., Xu S., Gregory T., *Detection of primary isolate-neutralizing antibodies in the sera of human immunized with a rgp120<sub>MN</sub> vaccine.* Conference on Advances in AIDS Vaccine Development, Bethesda, MD, February 11-15, 1996.