

VACUNAS, CÉLULAS Y ÁCIDOS NUCLEICOS¹

A. J. Zuckerman² y E. Deinhardt³

Los avances en la tecnología del DNA recombinante han aumentado la utilidad potencial de las líneas celulares continuas como sustratos para la propagación y producción de antígenos utilizables como vacunas. Sin embargo, han surgido dudas sobre la inocuidad de los productos biológicos producidos con estos métodos. Un Grupo de Estudio de la OMS concluyó que, en general, las líneas celulares continuas de mamífero son sustratos aceptables para la fabricación de productos biológicos y que su uso debe considerarse individualmente y estar sometido a vigilancia continua.

El empleo de líneas celulares continuas como sustratos para la propagación de virus y el desarrollo de vectores recombinantes para producir antígenos uti-

lizables como vacunas han sido motivo de prolongados debates, principalmente referentes a la inocuidad de las vacunas y, en particular, a la posibilidad de inducir transformaciones y cambios neoplásicos notables en el receptor (1).

Los progresos logrados en biología fundamental y en la tecnología del ADN recombinante proporcionan los medios para manufacturar productos biológicos a mayor escala que antes. Por consiguiente, de inmediato se ha hecho evidente la utilidad potencial de las líneas celulares continuas como sustratos. En 1981, el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en Patrones Biológicos aprobó el empleo de líneas celulares continuas no tumorigénicas y exentas de virus para producir la vacuna antipoliomielítica de virus muertos (2). Una preocupación importante era el riesgo de aparición a largo plazo de cambios malignos

¹ Se publica también en el *Bulletin of the World Health Organization* Vol. 68, No. 2, 1991, con el título "Vaccines, cells and nucleic acids". © Organización Mundial de la Salud, 1991. Este informe de un Taller sobre Vacunas Preparadas en Líneas Celulares Continuas de Mamífero, celebrado en Londres, Reino Unido, del 17 al 19 de julio de 1989, fue preparado por los autores en representación de los siguientes participantes: T. Bektimirov y D. Magrath (OMS, Ginebra, Suiza); J. Coffin (Universidad Tufts, Boston, MA, EUA); F. Deinhardt (Instituto Max von Pettenkofer, Munich, República Federal de Alemania); G. Eder (Immuno AG, Viena, Austria); R. Ellis (Laboratorios de Investigación Merck, Sharp y Dohme, West Point, PA, EUA); E. Esber (Administración de Alimentos y Medicamentos, Bethesda, MD, EUA); D. A. Galloway (Centro Fred Hutchinson de Investigaciones sobre el Cáncer, Seattle, WA, EUA); T. Harrison y A. J. Zuckerman (Escuela de Medicina, Royal Free Hospital, Londres, Reino Unido); M. Hilleman (Instituto Merck de Investigaciones Terapéuticas, West Point, PA, EUA); P. Howley (Instituto Nacional de Oncología, Bethesda, MD, EUA); P. Hosfschneider (Instituto Max Plank, Martinsreid, República Federal de Alemania); E. Kieff (Escuela de Medicina de Harvard, Boston, MA, EUA); L. Lasky (Genentech Inc., South San Francisco, CA, EUA); J. Lower (Instituto Paul Ehrlich, Fráncfort, República Federal de Alemania); P. Minor y G. Schild (Instituto Nacional de Estandarización y Control de Sustancias Biológicas, Potters Bar, Reino Unido); J. Peetermans (Laboratorios Smith Kline Biologicals, NV, Bélgica); W. Robinson (Escuela de Medicina de la Universidad de Stanford, Stanford, CA, EUA) y H. Temin (Universidad de Wisconsin, Madison, WI, EUA). Se publicará una versión en francés de este artículo en un número posterior del *Bull WHO*.

² Dirección postal: Royal Free Hospital School of Medicine, Rowland Hill Street, Londres NW3 2PE, Reino Unido.

³ Instituto Max V. Pettenkofer, Centro Colaborador de la OMS para Referencia e Investigaciones sobre la Hepatitis Vírica y el SIDA, Múnich, República Federal de Alemania.

como consecuencia de 1) el ADN heterogéneo contaminante, especialmente cuando el ADN contuviera secuencias potencialmente reguladoras o codificadoras de oncogenes procedentes de la célula huésped o cuando se empleara en la preparación de vectores recombinantes, 2) el uso de células que contuvieran virus endógenos o genomas víricos completos o incompletos persistentes, y 3) los efectos biológicos de las proteínas transformadoras. Después de muchas discusiones, se hizo particular hincapié en lograr la inocuidad de los productos biológicos en todas las etapas mediante a) el empleo de sustratos celulares normales y la verificación de la ausencia de contaminación por agentes extraños y b) la caracterización amplia del sustrato celular y la realización de pruebas rigurosas de los productos finales para garantizar la ausencia de agentes antigénicos contaminantes detectables, agentes extraños (incluidos los retrovirus) y sus productos, y ADN residual procedente de la célula huésped.

Un Grupo de Estudio de la OMS que se reunió en 1986 (3) llegó a la conclusión de que, en general, las líneas celulares continuas de mamífero son sustratos aceptables para la producción de sustancias biológicas, si bien al tomar una decisión en cuanto a la aceptabilidad de un determinado producto es preciso tener en cuenta las diferencias en la naturaleza de los productos y las características del proceso de fabricación (4).

En una reunión de un grupo de expertos de la Escuela de Medicina del Royal Free Hospital de Londres, celebrada del 17 al 19 de julio de 1989, se revisó la información teórica y experimental disponible sobre la inocuidad y los posibles riesgos del empleo de vacunas para la profilaxis de millones de individuos y lactantes sanos, pero no del empleo de sustancias biológicas terapéuticas en el tratamiento de pacientes. Los participantes consideraron la inocuidad de las vacunas recombinantes producidas en bacterias, levaduras y otras células eucariotas, incluidas células de aves, insectos y mamíferos, así como la utilización de diversos vectores preparados en esas células para producir los antígenos

deseados. La principal preocupación del grupo fue la inocuidad de esos productos, que depende principalmente del ADN residual presente en la vacuna y también de productos génicos tales como las proteínas reguladoras. A continuación se describen los temas analizados.

LÍNEAS CELULARES CONTINUAS

El ADN de los sistemas celulares

El ADN de un sistema celular, incluidos los componentes del medio de cultivo y todos los procesos de manufacturación, usado para la producción de vacunas puede obtenerse a partir de ADN de genomas celulares, así como de células y ácidos nucleicos de otros agentes.

Entre los muchos efectos posibles de la integración del ADN heterogéneo en las células, el único que se considera importante es la inducción de cambios premalignos como resultado de la activación de protooncogenes, la inserción de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumores. Otros efectos, como la destrucción de células individuales o la inducción de disfunción en ellas, por ejemplo, mediante la inactivación de genes, se consideraron irrelevantes.

El ADN heterogéneo se define como un complejo conjunto de secuencias, como el ADN celular de gran complejidad, en contraste con el ADN de complejidad limitada, como los genomas víricos o las secuencias clonadas en forma molecular. Los tres posibles efectos biológicos de la integración de ADN heterogéneo contaminante son:

- La introducción de protooncogenes activados que solo están presentes en

cantidades significativas en células neoplásicas o preneoplásicas.

□ La activación de protooncogenes, que es más probable que ocurra con el ADN de mamíferos, aunque también puede ser producida por cualquier ADN.

□ La inactivación de genes supresores de tumores, que puede ser causada por cualquier ADN.

Otros efectos secundarios resultantes del empleo de ácidos nucleicos de sistemas de cultivos celulares usados en la producción de vacunas podrían ser consecuencia de la exposición de agentes patógenos para el hombre a ácidos nucleicos infecciosos, incluida posiblemente una forma infecciosa de un agente causante de la encefalopatía esponjiforme, que puede o no ser un ácido nucleico.

En la producción de vacunas nunca se deben usar sistemas celulares que contengan un virus infeccioso contaminante.

El ADN de vectores preparados para la expresión de antígenos

Estos vectores pueden ser dirigidos por secuencias de control de distintos orígenes, que abarcan desde el ADN de virus tumorales al ADN de fagos o plásmidos de células microbianas. Se consideró que el origen de estas secuencias de control no influye en su eficacia para activar la inserción de protooncogenes, pero que sí lo hace su potencia. Como las células que contienen el vector tienen sus propias secuencias reguladoras potentes, los elementos de control que agrega el vector solo tienen un pequeño efecto adicional. No obstante, si se amplifican las secuencias del vector puede aumentar su importancia relativa. Esto significa que las secuencias de control contaminantes potentes pueden aumentar la probabilidad de que se produzca una transformación celular. También se reconoció que las bacterias o levaduras promotoras son menos eficaces en las células de mamífero y viceversa. Si se emplean secuencias de control derivadas de virus de tumores, estas deben tener una

longitud limitada, para asegurar que no incluyen secuencias codificadoras de oncoproteínas.

Aunque es muy poco probable que la presencia de ADN heterogéneo en una vacuna (cualquiera que sea su origen) induzca un cambio premaligno, es preferible usar un sistema con las menores posibilidades de inducir una transformación celular en los receptores de la vacuna; también se debe mantener la pureza y la eficacia de la vacuna, ya que esta podría usarse en millones de lactantes o recién nacidos y el período de latencia previo a la aparición de una enfermedad neoplásica puede oscilar entre 10 y 30 años o más. Por otra parte, en ciertos individuos y grupos de población puede existir un mayor riesgo —si bien no ha sido comprobado— como consecuencia de anomalías genéticas o inmunodeficiencias heredadas o adquiridas u otras influencias del ambiente.

Si bien la cantidad aceptable de ADN heterogéneo en la preparación de vacunas no puede definirse con precisión, debe ser lo más baja posible. De acuerdo con la información teórica y experimental disponible, se han usado cantidades máximas de 100 pg por dosis por vía parenteral, la cual proporciona un buen margen de inocuidad. Se escogió esta cantidad porque no siempre es posible medir cantidades inferiores de ADN y parece ser fácil obtener una cantidad menor que 100 pg (3).

Proteínas

Los participantes reafirmaron la conclusión de que la presencia de proteínas contaminantes —a las concentraciones en que suelen encontrarse en las vacunas adecuadamente purificadas— no constituye un riesgo serio cuando se preparan en líneas celulares continuas, pero sí cuando actúan como inmunógenos.

EL EMPLEO DE VIRUS VIVOS

Vacunas orales de virus vivos atenuados

Se considera que el ADN heterogéneo contaminante en las vacunas administradas por vía oral constituye un riesgo aun menor que el de las vacunas administradas por vía parenteral, a causa de la acción de las nucleasas u otros factores intestinales. Sin embargo, no se cuenta con pruebas convincentes sobre esta afirmación. Por consiguiente, es conveniente eliminar el ADN de los productos destinados a la administración oral y de los preparados con líneas celulares continuas consideradas adecuadas como sustratos para la preparación de productos inyectables. En el caso de los virus replicables, al elegir las medidas de purificación se deben tener en cuenta los posibles efectos sobre las propiedades del virus de la vacuna.

Virus usados como vectores

En la producción de vacunas de virus vivos o de antígenos en cultivos celulares se están utilizando cepas de virus vaccinia o herpes sin neurovirulencia, adenovirus o poliovirus atenuados tipo 1, algunos virus de insectos y posiblemente otros para obtener virus híbridos. La eficacia y la inocuidad en cada caso se deben evaluar individualmente. Lo mismo es válido para el empleo de ciertas bacterias con genomas víricos insertados que se van a utilizar como vacunas vivas por vía oral.

SELECCIÓN DE SUSTRATOS CELULARES

Al seleccionar sustratos celulares para producir vacunas, es preciso tener presentes los siguientes requisitos ya adoptados por un organismo regulador nacional (Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos

de América, Administración de Alimentos y Medicamentos):

- datos disponibles sobre el sustrato celular;
- riesgo potencial;
- decisión caso por caso, evaluando riesgos y beneficios;
- pureza del producto final;
- medidas de inactivación durante la fabricación;
- población a la que está destinado el producto, y
- posibles sistemas de producción de menor riesgo potencial.

CONCLUSIONES

La formulación de políticas y normas reguladoras para la producción de vacunas y su inocuidad es muy compleja y, ya que no existe información definitiva, debe basarse, al menos en parte, en especulaciones y criterios bien fundados. Los participantes de la reunión hicieron hincapié en la necesidad de un diálogo continuo para revisar, obtener y mantener un consenso fructífero entre un amplio sector multidisciplinario de la comunidad científica. Además, coincidieron en que algunas líneas celulares continuas son un sustrato adecuado para la producción de vacunas y, de hecho, pueden ser en el futuro la única fuente disponible de ciertos productos, si bien es preciso analizar su uso en cada caso particular y manteniendo una vigilancia continua.

REFERENCIAS

- 1 Hayflick, L. y Hennessen, W. Continuous cell lines as substrates for biologicals. *Dev Biol Stand* 70:1-304, 1989.

- 2 Organización Mundial de la Salud. *Normas para la vacuna antipoliomielítica (inactivada)*. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. Ginebra, 1982. Serie de Informes Técnicos 673, Anexo 2, pp. 41–89.
 - 3 Organización Mundial de la Salud. *Aceptabilidad de los sustratos celulares para la producción de sustancias biológicas. Informe de un Grupo de Estudio de la OMS*. Ginebra, 1987. Serie de Informes Técnicos 747.
 - 4 Organización Mundial de la Salud. *Normas para líneas celulares continuas utilizadas en la producción de sustancias biológicas*. Comité de Expertos de la OMS en Patrones Biológicos. Ginebra, 1987. Serie de Informes Técnicos 745, pp. 99–110.
-

SUMMARY

VACCINES, CELLS AND NUCLEIC ACIDS

Progress in recombinant DNA technology has increased the potential usefulness of continuous cell lines as substrates for virus propagation and production of antigens for use as vaccines. However, concerns

about the safety of the biologicals so produced have been raised. A WHO Study Group concluded that, in general, continuous mammalian cell lines are acceptable as substrates for the production of biologicals, but that their use must be considered on a case-by-case basis and be subjected to continuing surveillance.