

Transmisión de inmunidad a través de la lactancia

Luis Enjuanes, Cristian Smerdou,
Carlos M. Sánchez, Inés M. Antón,
Juan M. Torres, Miguel Medina,
María L. Ballesteros, Ana Méndez, y Joaquin Castilla

Centro Nacional de Biotecnología - Centro de Biología Molecular,
CSIC-Universidad Autónoma.

Vacunas para la salud humana y animal

Las vacunas consisten en antígenos, normalmente proteínas o agentes infecciosos atenuados, que inducen una respuesta inmune que protege frente a infecciones por microorganismos. La aplicación de las vacunas en la prevención de infecciones tiene una excelente relación beneficio: coste. Las vacunas continúan siendo un objetivo de interés para la industria farmacéutica, fundamentalmente porque: a) el número de muertes debidas a enfermedades inmunizables es muy alto; b) muchas vacunas en uso tienen efectos laterales y riesgos elevados; c) continuamente aparecen agentes infecciosos nuevos; d) se han desarrollado nuevas tecnologías que permiten el diseño de vacunas más efectivas y seguras; e) hay una tendencia a reconvertir muchas vacunas a formas administrables por vía oral, por su mayor comodidad y porque por esta vía se induce con mayor facilidad inmunidad en mucosas; y, f) el consumo de vacunas crece, dado que se incorporan a su administración los países en vías de desarrollo.

Durante el siglo pasado se desarrollaron dos vacunas para el área de la salud humana, que protegían frente a la rabia y la viruela. Durante el siglo veinte se han obtenido otras 17 vacunas (Figura 1). Se espera que en los próximos 20 años se desarrollen unas 20 vacunas para salud humana. Las vacunas en uso frecuente son distintas en los países desarrollados respecto a los países en desarrollo, también llamados países del Norte y del Sur, respectivamente, siendo también distintos los grupos a los que van dirigidas (Tabla 1).

Todas las vacunas empleadas en salud humana son vacunas clásicas, es decir, se basan en agentes infecciosos atenuados o inactivados siguiendo procedimientos experimentales no controlados. Existe una sola excepción, la vacuna de la hepatitis B, obtenida por ingeniería genética. Muchas de las vacunas utilizadas en salud humana o animal en uso producen efectos secundarios, teniendo ventajas distintas según se trate de vacunas inactivadas o vivas (infectivas) (Tabla 2). Se están desarrollando nuevas vacunas por ingeniería genética, con modificaciones definidas, para la mayor parte de las vacunas clásicas en uso. Estas vacunas serán más seguras y tendrán costes de producción inferiores a los de las vacunas clásicas.

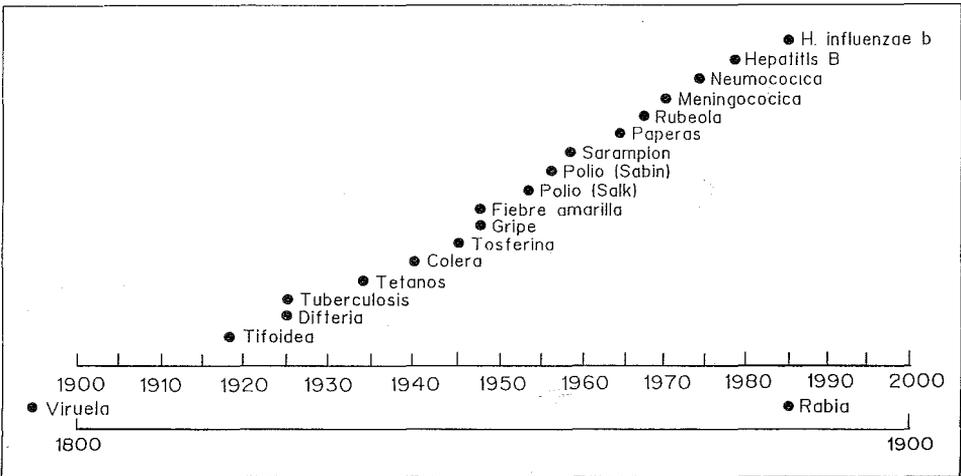


Figura 1. Vacunas desarrolladas desde Jenner

TABLA 1. Vacunas en uso

Paises del norte	Paises del sur
Difteria	Difteria
Tosferina	Tosferina
Sarampión	Sarampión
Polio	Polio
Paperas	BCG
Rubeola	
VACUNAS PARA PERSONAS EN EDAD AVANZADA	
Gripe	
Neumococcidiosis	
VACUNAS PARA VIAJEROS	
Tifus	
Cólera	
VACUNAS PARA GRUPOS DE RIESGO	
Hepatitis	

TABLA 2 Ventajas y desventajas de las vacunas

PROPIEDAD	INACTIVADA	VIVA
Respuesta desequilibrada	+	-
Respuesta inmune sistémica y local desequilibrada	+	-
Immunización intramuscular inefectiva en la inducción de respuesta en mucosas	+	-
Immunización de corta duración	+	-
Respuesta T citotóxica baja	+	-
Inducción de DTH	+	-
Virulencia residual	-	+
Contaminación con otros virus	-	+
Inestabilidad genética	-	+

Existen vacunas de muchos tipos (Tabla 3). Normalmente se dividen en vacunas vivas e inactivadas. Las primeras son por lo general formas atenuadas de los agentes infectivos. Las segundas pueden ser sintéticas o biosintéticas, según se obtengan químicamente, o por expresión de los antígenos utilizando vectores

TABLA 3 Tipos de vacunas

VIVAS	ATENUADAS	Mutantes sensibles a temperatura Mutantes específicos de hospedador Mutantes adaptados al frío Mutantes de delección Recombinantes	
	VIRULENTAS		
INACTIVAS	VIRIONES	Purificadas Sintetizadas químicamente Biosintéticas Mimotopos	
	SUBUNIDADES		Sintéticos Biosintéticos
	ANTI-IDIOTIPICAS		

vivos. La tendencia actual es desarrollar vacunas biosintéticas utilizando sistemas de expresión procarióticos (como *Escherichia coli*) o eucarióticos (como baculovirus, poxvirus, o adenovirus). Posiblemente, las vacunas de las próximas décadas se basarán en la construcción de virus defectivos, es decir, virus que cuando entran en una célula producen el antígeno inmunizante, pero que no dan lugar a viriones progenie. Ello las convierte en vacunas de alta seguridad. El diseño de nuevas vacunas casi siempre va precedido de un conocimiento profundo de la estructura y la biología molecular del virus. En la actualidad los procedimientos de obtención de vacunas son muy diversos y utilizan desde diseños por ordenador, basados en programas gráficos, hasta la construcción por ingeniería genética de nuevos microorganismos autoreplicativos.

Nuestro laboratorio trabaja en el estudio de las bases moleculares para la protección frente a enfermedades producidas por coronavirus, particularmente por el virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT), que ocasiona elevadas pérdidas en la cabaña porcina. Se ha determinado la estructura antigénica del VGPT y ésta se ha correlacionado con la estructura física del virus, lo que ha permitido conocer los determinantes implicados en protección (Correa y col., 1990; Suñé y col., 1990; Gebauer y col., 1991). Posteriormente se han determinado los antígenos más conservados, y por tanto con mayor potencial para inmunizar frente a un número elevado de virus (Sánchez y col., 1990). Entre los fines aplicados de nuestra investigación se encuentra el desarrollo de vacunas que induzcan inmunidad en mucosas y secretoria, para proteger frente al VGPT

y coronavirus relacionados, y en la obtención de animales transgénicos resistentes a infecciones por coronavirus (Enjuanes y Van der Zeijst, 1992).

Diseño de vacunas para la inducción de inmunidad en mucosas

La mayor parte de los virus infectan las mucosas o las utilizan como vía de entrada. Por ello es interesante el desarrollo de vacunas que induzcan inmunidad secretoria. Este tipo de inmunidad se estimula preferentemente presentando el antígeno en centros linfáticos asociados al tracto gastrointestinal. Esta presentación dirigida se puede realizar fundamentalmente por dos procedimientos: diseñando complejos antigénicos que tengan afinidad por células epiteliales intestinales, o desarrollando vectores vivos con tropismo por tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal. Un procedimiento distinto de los anteriores, para proporcionar anticuerpos en mucosas es el desarrollo de animales transgénicos que produzcan anticuerpos de especificidad definida, que alcanzarían las mucosas a través de las glándulas mamarias. En nuestro laboratorio se están desarrollando estas estrategias. Los vectores con tropismo entérico utilizados son de dos tipos: a) vectores procarióticos (formas atenuadas de *Salmonella typhimurium*); y, b) vectores eucarióticos (adenovirus humanos). Estos vectores, cuando se administran oralmente, actúan como vehículos que viajan hasta los órganos linfáticos asociados al intestino e infectan estos tejidos, expresando los antígenos del virus de la GPT. Asimismo, se están desarrollando vectores basados en coronavirus porcinos con un tropismo por tracto gastrointestinal.

Existen formas avirulentas de *S. typhimurium* con uso potencial como vacunas. Estas bacterias son dobles mutantes $\Delta cya \Delta crp$, incapaces de producir AMPc o su receptor (CRP) (Nakayama y col., 1988; Curtiss y col., 1990). Estos mutantes son completamente avirulentos, pero mantienen su inmunogenicidad y su tropismo, siendo capaces de colonizar el tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal y persistir en esta localización hasta tres semanas. Uno de estos mutantes se ha utilizado para clonar y expresar varios fragmentos de la proteína S del VGPT. Estos fragmentos contienen determinantes antigénicos potencialmente implicados en protección. El gen que codifica la proteína S del VGPT se clonó previamente en el vector Bluescript (Correa y col., 1990). Tres fragmentos parcialmente solapantes del gen, que en conjunto lo contienen en su totali-

dad, de 1587, 2.195 y 1298 pb, así como el gen completo, de 4628 pb, fueron subclonados en el plásmido de expresión pYA292 (Curtiss y col., 1990; Nakayama y col., 1988), bajo el control del promotor *P_{trc}*, obteniéndose los plásmidos recombinantes pYATS-1, pYATS-2, pYATS-3 y pYATS-4, respectivamente. El plásmido pYA292 lleva como marcador de selección el gen *asd* que codifica el enzima aspartato β-semialdehído deshidrogenasa, implicado en la síntesis del ácido diaminopimélico (DAP), un componente de la pared de bacterias gram negativas. La mutación Δasd es una mutación letal, ya que la ausencia del DAP conduce a la lisis celular. La combinación de bacterias Δasd con plásmidos *asd*⁺ constituye un sistema ideal para el mantenimiento estable de plásmidos evitando la utilización de marcadores de resistencia a antibióticos. Los plásmidos pYATS-1, pYATS-2, pYATS-3 y pYATS-4 se clonaron en *S. typhimurium* $\Delta cya \Delta crp \Delta asd$ a través de dos sistemas bacterianos intermedios (Figura 2). En primer lugar se introdujeron por electroporación en *E. coli* 6097 F($\Delta asd \Delta [pro-lac]$ 80 *lacZ* $\Delta M15$) (Nakayama y col., 1988) con el fin de aumentar la eficiencia de transformación, que en *Salmonella* es muy baja. En una segunda etapa los plásmidos recombinantes multiplicados en *E. coli* se electroporaron en *S. typhimurium* 3730 pYA232 ($\Delta asd hsdLT hsdSA hsdSB$). Esta bacteria tiene mu-

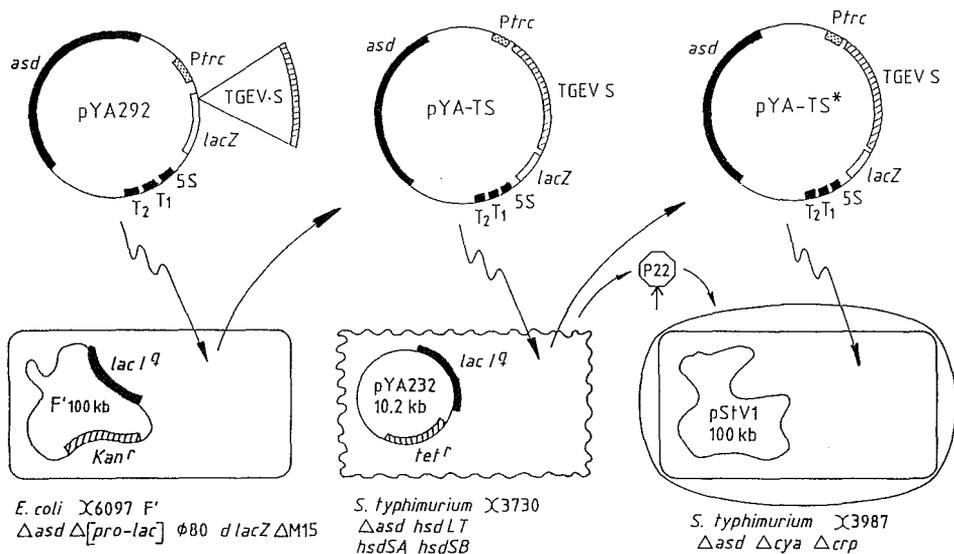


Figura 2. Obtención de *Salmonella typhimurium* recombinante que expresa antígenos del VGPT

tados los tres sistemas de restricción de *Salmonella*, pero no los sistemas de modificación, y su función es modificar convenientemente el ADN para que no sea degradado en la cepa final. Por último, los plásmidos se electroporaron en *S. typhimurium* 3987 (Δ *cyd* Δ *crp* Δ *asd*). Las dos bacterias intermedias 6097 y 3730 llevan el gen *lacI^q*, que codifica el represor del promotor *P_{trc}*, por lo que la expresión de los plásmidos derivados de pYA292 en estos sistemas sólo se induce en presencia de IPTG. Por el contrario, en la *Salmonella* 3987 la expresión de los plásmidos recombinantes es constitutiva. Se analizó la expresión de los cuatro plásmidos pYATS en los tres sistemas bacterianos mediante electrotransferencia e inmunoadsorción, utilizando anticuerpos policlonales contra el VGPT y monoclonales contra la proteína S (Tabla 4). Los fragmentos aminoterminales, producto de pYATS-1, y la proteína S completa, producto de pYATS-4, fueron las construcciones que se expresaron más eficientemente, tanto en sistemas inducibles como en χ 3987. El fragmento intermedio, producto de pYATS-2, se expresó adecuadamente en sistemas inducibles, pero se perdió la expresión en χ 3987. Finalmente, el fragmento carboxiterminal mostró una elevada toxicidad en los tres sistemas bacterianos utilizados, no llegándose a detectar su expresión. Ello podría ser debido a la falta de anticuerpos específicos con título

TABLA 4 Expresión de antígenos del VGPT mediante plásmidos recombinantes en diferentes sistemas bacterianos

BACTERIA	PLASMIDO	ANTICUERPO		
		Policlonal VGPT-específico	MAb proteína-S	MAB Proteína-N
χ 6097	pYA292	-	-	-
	pYATS1	+++	+++	-
	pYATS2	+++	ND	-
	pYATS3	-	ND	-
	pYATS4	+++	+++	-
χ 3730	pYA292	-	-	-
	pYATS1	++	+++	-
	pYATS2	+++	+++	-
	pYATS3	-	ND	-
	pYATS4	++	++	-
χ 3987	pYA292	-	-	-
	pYATS1	+	+++	-
	pYATS2	-	-	-
	pYATS3	-	ND	-
	pYATS4	+	+	-

los altos contra esa zona, que mostró en experimentos previos baja inmunogenicidad (Correa y col., 1988).

Se seleccionaron en un principio las construcciones χ 3987 pYATS-1 y χ 3987 pYATS-4 como las más adecuadas para ser utilizadas como vectores *in vivo*, dados los niveles de expresión constitutiva que presentaban. Se estudió la estabilidad de la expresión de los productos recombinantes antes de administrarlos *in vivo*. Para ello se cultivaron de cada una de las cepas seleccionadas 10, 25 y 50 generaciones y se analizó el porcentaje de colonias que mantenían la expresión en cada caso. La cepa 3987 pYATS-1 resultó ser la más estable, con un 100% de colonias que expresan un producto recombinante a las 25 generaciones y un 60% después de 50 generaciones. Sin embargo, la bacteria transformada χ 3987 pYATS-4 mostró niveles de estabilidad más bajos, puesto que a las 50 generaciones sólo un 20% de las bacterias mantenían la expresión. Dados estos resultados se seleccionó χ 3987 pYATS-1 para estudiar su inmunogenicidad y capacidad de colonización *in vivo*. Experimentos preliminares en cerdos y ratones mostraron que se produjo colonización bacteriana en el tracto digestivo, hígado y bazo, y se pudo detectar respuesta inmune anti-*Salmonella* en los animales inoculados. Se está evaluando la respuesta contra el VGPT

En la proteína S del VGPT existen secuencias lineales cortas que son capaces de ser reconocidas por anticuerpos monoclonales. Entre ellas se encuentra la secuencia correspondiente al sitio antigénico D (Correa y col., 1988). Este es un sitio lineal capaz de inducir anticuerpos neutralizantes, que consta de una secuencia central de 7 aminoácidos SYGEIPFG, incluida en una secuencia de 27 aminoácidos flanqueada por dos cisteínas. Estas dos cisteínas probablemente forman un puente disulfuro, dando lugar a una estructura con forma de lazo, en la que la secuencia central quedaría altamente expuesta. Se ha demostrado que péptidos sintéticos que representan el sitio D son capaces de inducir anticuerpos neutralizantes en conejos (Posthumus y col., 1990; C. Smerdou y L. Enjuanes, resultados no publicados). El oligonucleótido se clonó en el plásmido de expresión pYA3048 (Jagustzyn-Krynickett y Curtiss, resultados no publicados) en fase con el extremo carboxiterminal del gen LT-B, que codifica la subunidad B de la toxina termolábil de *E. coli*, bajo el control del promotor *P_{trc}*. Esta toxina actúa como un potente adyuvante en la inducción de respuestas en el tracto gastrointestinal, induciendo preferentemente el isotipo IgA de las inmunoglobulinas. Su eficacia está basada en la formación de pentámeros con afinidad por el

gagliósido GM1, muy abundante en la superficie de las células epiteliales intestinales, lo que facilita la presentación intestinal del antígeno asociado. Se obtuvo una colección de plásmidos recombinantes que se denominaron pYALT-D, que incluían construcciones en las que el oligonucleótido del sitio D se había introducido en forma de monómero o polímero (Figura 3). Se analizó la expresión de los plásmidos pYALT-D en los dos sistemas bacterianos inducibles *E. coli* λ 6097F¹ y *S. typhimurium* λ 3730 pYA232 mediante electrotransferencia e inmunoadsorción con AcMs específicos del sitio D, 1DG3 y 8DH8 (Jiménez y col., 1986). Se seleccionaron cuatro construcciones del sitio D que expresaron la subunidad LT-B con uno a cuatro sitios D en el extremo carboxiterminal. Todos estos productos recombinantes se asociaban formando pentámeros que expresaban de 5 a 20 sitios D por complejo, respectivamente. La estabilidad de los complejos después de 50 generaciones era próxima al 100%. En la actualidad se está analizando su potencial inmunogénico *in vivo*.

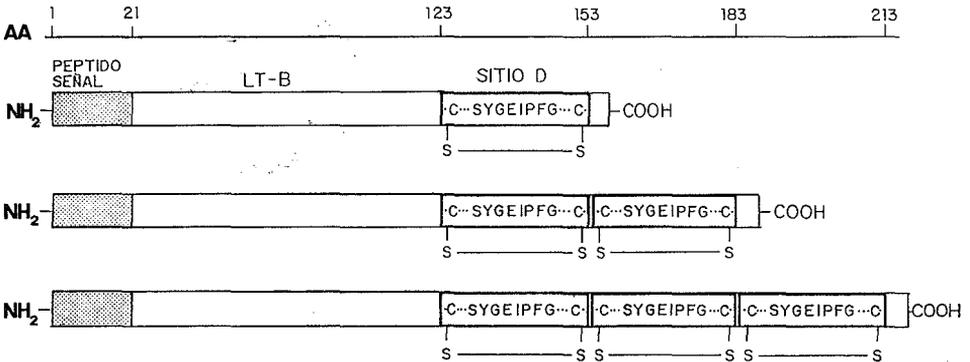


Figura 3. Productos de fusión entre la subunidad B de la toxina labil de *E. coli* y el sitio antigénico D.

La expresión en vectores eucarióticos como adenovirus es importante en el caso de los antígenos del VGPT dependientes de glicosilación, como los sitios A y B. Los adenovirus tienen tropismo entérico y un genoma ADN, lo que facilita su uso como vectores (Graham y Prevec, 1992). La expresión heteróloga, usando adenovirus, se puede conseguir mediante la recombinación entre el ge-

noma de un adenovirus defectivo y secuencias de adenovirus que flanqueen un gen heterólogo clonado en un plásmido. Se ha utilizado la región dispensable E3 del adenovirus Ad5 para clonar antígenos del VGPT. En nuestro laboratorio se han clonado en Ad5 nueve fragmentos del gen S (Figura 4). Se recuperaron virus Ad5 recombinantes que contenían secuencias del VGPT después de co-transformar células humanas 293 con dos plásmidos que codifican las porciones derecha e izquierda, respectivamente, del genoma del adenovirus humano. De ellos, tres expresaron antígenos del virus GPT. Interesantemente, el recombinante Ad5-PS-3 inoculado en hamsters, indujo anticuerpos neutralizantes para el VGPT. Ello indica que estos vectores pueden ser muy útiles para la protección frente a la GPT.

Desarrollo de animales transgénicos productores de sustancias activas o resistentes a infecciones virales

Los animales transgénicos se obtienen normalmente por introducción de genes en animales convencionales o por modificación de genes preexistentes, de forma que la alteración genética se transmita a la descendencia. Los animales transgénicos se pueden considerar como biorreactores con una capacidad de multiplicación ilimitada, y con un elevado potencial productor de fármacos, a bajos costes. Hasta hace poco, el desarrollo de estos animales modificados ge-

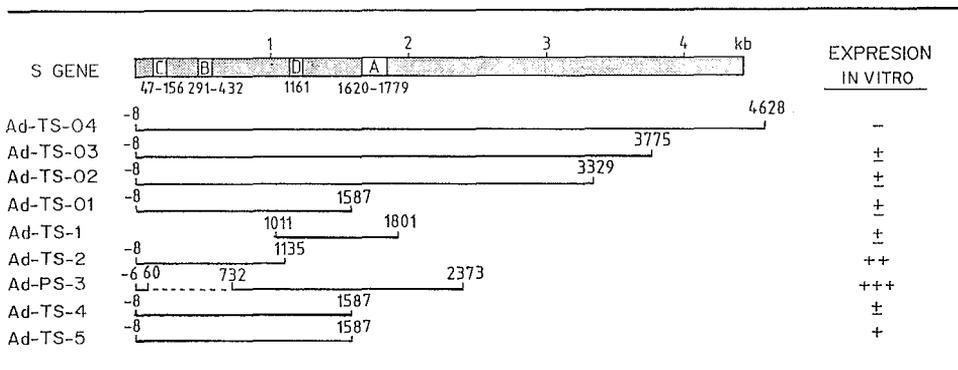


Figura 4. Fragmentos del gen S del VGPT colnados en Ad5.

néticamente se consideraba un proyecto lejano. Actualmente, varios tipos de animales transgénicos se encuentran a las puertas de la comercialización.

Obtención de animales transgénicos

La introducción de genes en las líneas germinales de mamíferos se puede realizar por varios procedimientos: a) microinyección del ADN directamente en el pronúcleo de huevos fertilizados (Figura 5); b) infección de embriones implantados previamente con retrovirus portadores de los genes de interés; c) producción de animales quiméricos por combinación de células de los embriones de varios animales; y, d) utilización de células progenitoras embrionarias para la introducción de genes exógenos en blastocistos. No obstante, la microinyección

directa del ADN en el pronúcleo de huevos fertilizados es la técnica más usada.

El primer artículo describiendo la obtención de animales transgénicos se publicó en 1980. Posteriormente, se mostró que los genes extraños se integran en los cromosomas celulares y pasaban a la progenie vía línea germinal. En los siguientes años muchos investigadores obtuvieron animales transgénicos, incluyendo ratones, ovejas, cerdos, conejos, vacas, cabras, y peces. Normalmente el desarrollo de anima-

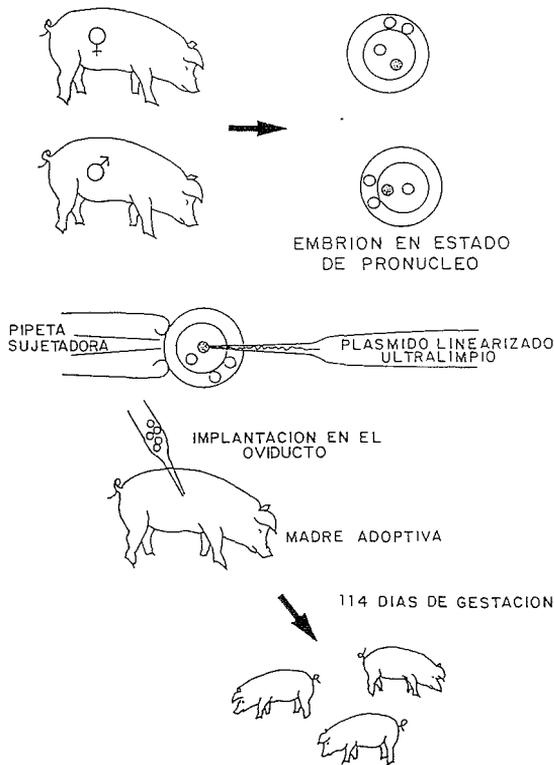


Figura 5. Obtención de cerdos transgénicos

les transgénicos es un proceso largo y costoso. Por ejemplo, la obtención de un cerdo transgénico puede tardar cinco años y costar 50 millones de pesetas. Esto impone una limitación seria sobre el número y tipo de animales transgénicos a generar. Ello hace que los ADNs extraños que se quieran introducir en los animales deben construirse y seleccionarse cuidadosamente antes de iniciarse la obtención del animal transgénico. Para ello, está siendo de gran ayuda el desarrollo de sistemas de transformación por proyectiles de tungsteno recubiertos con DNA, que se aceleran mediante sistemas de gases comprimidos (biolística). Estos proyectiles al introducirse en los tejidos de animales vivos producen localmente una expresión transitoria del producto de interés, lo que permite anticipar si el animal transgénico que se proyecta construir va a funcionar.

Tipos de animales transgénicos

Los animales transgénicos pueden ser de tres tipos: a) productores de sustancias activas sobre el propio animal, como la hormona del crecimiento; b) productores de sustancias de interés farmacológico; y, c) animales resistentes a enfermedades. Ejemplos de productos obtenidos en animales transgénicos de los dos primeros tipos se resumen en la Tabla 5. El enfisema pulmonar se produce por la falta de α -1-antitripsina. Un paciente con esta deficiencia requiere al año 200 g de antitripsina para su tratamiento. Teniendo en cuenta que existen 20.000 enfermos de este tipo, se deducirá la importancia de unas ovejas transgénicas desarrolladas que secretan este fármaco en la leche. Asimismo, se han obtenido cabras transgénicas productoras del activador del plasminógeno, un fármaco útil en el tratamiento de la oclusión coronaria. Se han obtenido cerdos transgénicos productores de la hormona bovina del crecimiento. Estos animales

TABLA 5 Productos farmacológicos obtenidos en animales trasgénicos

α -1-Anti-tripsina	⇔	Enfisema pulmonar
Activador del plasminogeno	⇔	Oclusión coronaria
Lactofenina	⇔	Antibacteriano
Hormona crecimiento	⇔	Desarrollo
Inmunoglobulinas	⇔	Terapia

crecen más deprisa que los normales y producen menos grasa, pero presentan problemas fisiológicos cuando son adultos. Las vacas producen anualmente 10.000 litros de leche; se han diseñado vacas transgénicas que secretan fármacos de alto valor en la leche. Teniendo en cuenta que se pueden obtener 30 g de un fármaco por litro de leche, una sola vaca produciría 300 kg de este producto por año. Esto convierte a este tipo de animales transgénicos en biorreactores de alto interés.

Los animales típicamente productores de leche como las vacas, ovejas y cabras, tienen la ventaja de poder ser convertidos en animales transgénicos que secreten productos farmacéuticos. Los cerdos, que habitualmente no se explotan como animales productores de leche, tienen grandes ventajas para ser transformados en animales transgénicos por varias razones: a) el número de óvulos fertilizados obtenido de una cerda preñada es superior al que se puede obtener de las vacas, ovejas y cabras; b) los cerdos son múltiparos y pueden ser receptores de un mayor número de embriones por animal; c) la eficiencia en la producción de cerdos transgénicos por óvulo inyectado es del 0.3%, una eficiencia análoga a la obtenida en otras especies; y, d) los intervalos de generación de los cerdos son de 11 meses, mientras que para las cabras y vacas oscilan entre 11 y 24 meses. Globalmente, la ventaja del uso de cerdos en la obtención de animales transgénicos, respecto a las otras especies, se podría estimar de 6 a 1. En el caso de los cerdos transgénicos, de alto interés socioeconómico, la tendencia se centra en la actualidad en el desarrollo de animales resistentes a infecciones virales. La idea es construir animales supertransgénicos con resistencia a diversas enfermedades. Estos animales transgénicos son de varios tipos, algunos de los cuales se describen a continuación.

La inmunidad intracelular está basada en la expresión de una proteína viral anómala que interfiere en la replicación del virus salvaje. Se han obtenido animales transgénicos que expresan este tipo de proteínas interferentes y evitan la replicación del virus salvaje, originando un nuevo tipo de inmunidad que actúa a nivel intracelular. Esta inmunidad no se basa en la inducción de anticuerpos o linfocitos citotóxicos, como la respuesta inmune habitualmente conocida. Ello ha permitido el desarrollo de células con resistencia a los virus Herpes, al virus productor del sida, y a los virus causantes de la leucosis aviar y de la gripe.

Otro tipo de animales transgénicos resistentes a enfermedades se basa en la existencia de la proteína Mx1 en ciertas estirpes de animales, lo que les confiere

re resistencia a la infección por virus como el de la gripe. Esta proteína se induce por el interferón, que a su vez se produce como respuesta a ciertas infecciones virales. Se han obtenido ratones transgénicos en los que se ha introducido el gen de la proteína Mx1. Cuando estos animales se infectan por ciertos virus, se induce interferón, lo que activa la resistencia a la infección.

Un tercer tipo de animales transgénicos, productores de inmunoglobulinas secretadas en la leche, se está desarrollando en nuestro laboratorio. El objetivo es obtener cerdas transgénicas que secreten en la leche anticuerpos monoclonales que confieran protección a la prole, contra infecciones por coronavirus u otros virus intestinales. Muchos virus y bacterias infectan a los animales recién nacidos en un momento en el que su sistema inmune no está desarrollado para desencadenar una respuesta inmunológica protectora. La protección en estos casos se proporciona a los recién nacidos a través de la leche. Durante la lactancia, las madres inmunizadas activamente antes del parto, secretan inmunoglobulinas, que son adsorbidas por la prole en las primeras horas después del nacimiento (inmunidad lactogénica). El virus de la GPT infecta a los lechones recién nacidos y causa su muerte en unos pocos días. Se ha determinado que la administración oral de inmunoglobulinas purificadas específicas para el virus proporciona protección frente a la GPT. Asimismo, se han obtenido anticuerpos monoclonales que reconocen un determinante antigénico altamente conservado en el virión. Estos anticuerpos neutralizan la infectividad viral muy eficientemente. El proyecto que se está desarrollando propone la expresión de los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de este anticuerpo monoclonal, bajo el control del promotor *wap*. Este promotor controla la expresión de una proteína muy abundante en la leche y el calostro, y sólo se activa en glándulas mamarias durante la lactancia. Ello permitirá la obtención de animales transgénicos que transfieran en la leche, a los lechones recién nacidos, un anticuerpo neutralizante para el virus GPT, proporcionándoles resistencia a la infección por este virus. La resistencia de estos animales transgénicos a infecciones virales, se puede ampliar a otros agentes patógenos que infecten el tracto gastrointestinal durante los primeros días de vida.

El desarrollo de animales transgénicos es una tarea compleja que requiere la colaboración de al menos tres equipos con experiencia en la biología molecular e inmunología del virus, el control de la expresión génica específica de tejido, y la obtención de animales transgénicos. Grupos expertos en estas áreas

existen en España, por lo que mediante una colaboración adecuada, se puede conseguir en nuestro país el desarrollo de estos animales.

Conclusiones

El diseño de procedimientos para la inducción de inmunidad en mucosas y lactogénica se considera de alto interés. Uno de los métodos más efectivos es la obtención de vectores bacterianos o virales con tropismo por tejido linfoide asociado al tracto gastrointestinal. Vectores con estas características, basados en formas avirulentas de *S. typhimurium* o adenovirus han dado resultados prometedores. El diseño de nuevos vectores, basados en virus defectivos con tropismo entérico se considera una tendencia clara en el desarrollo de nuevas vacunas.

La obtención de animales transgénicos es una realidad y está próxima a la comercialización. Están particularmente avanzados los animales productores de fármacos de interés, o de sustancias que influyen en el desarrollo de razas con un mayor rendimiento. Se prevé que el interés de los animales transgénicos vaya en aumento. En un futuro próximo se utilizarán animales que produzcan sustancias activas sobre ellos mismos, con preferencia a animales a los que se les administran estas sustancias en la dieta. El desarrollo de animales transgénicos requiere la colaboración entre varios equipos, preferentemente de organismos públicos de investigación y del sector privado.

REFERENCIAS

- Correa, I., Jiménez, G., Suñé, C., Bullido, M. J., and Enjuanes, L. (1988). Antigenic structure of the E2 glycoprotein from transmissible gastroenteritis coronavirus. *Vir. Res.* 10, 77-94.
- Correa, I., Gebauer, F., Bullido, M. J., Suñé, C., Baay, M. F. D., Zwaagstra, K. A., Posthumus, W. P. A., Lenstra, J. A., and Enjuanes, L. (1990). Localization of antigenic sites of the E2 glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J. Gen. Virol.* 71, 271-279.
- Curtiss III, R., Galan, J. E., Nakayama, K., and Kelly, S. M. (1990). Stabilization of recombinant avirulent vaccine strains *in vivo*. *Res. Microbiol.* 141, 797-805.
- Enjuanes, L., and Van der Zeijst, B. A. M. (1992). Molecular basis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) epidemiology. In "Coronaviruses." (S. G. Siddell, eds), Plenum Press, New York. En prensa.
- Graham, F. L., and Prevec, L. (1992). Adenovirus-Based Expression Vectors and Recombinant Vaccines. In "Vaccines: New Approaches to Immunological Problems" (R. W. Ellis, eds.), pp. 363-385.
- Gebauer, F., Posthumus, W. A. P., Correa, I., Suñé, C., Sánchez, C. M., Smerdou, C., Lenstra, J. A., Meloen, R., and Enjuanes, L. (1991). Residues involved in the formation of the antigenic sites of the S protein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virology* 183, 225-238.
- Jiménez, G., Correa, I., Melgosa, M. P., Bullido, M. J., and Enjuanes, L. (1986). Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J. Virol.* 60, 131-139.
- Nakayama, K., Kelly, S. M., and Curtiss III, R. (1988). Construction of an *asd*⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain. *Biotechnology* 6, 693-697.
- Posthumus, W. P. A., Lenstra, J. A., Schaaper, W. M. M., van Nieuwstadt, A. P., Enjuanes, L., and Meloen, R. H. (1990). Analysis and simulation of a neutralizing epitope of transmissible gastroenteritis virus. *J. Virol.* 64, 3304-3309.

- Sánchez, C. M., Jiménez, G., Laviada, M. D., Correa, I., Suñé, C., Bullido, M. J., Gebauer, F., Smerdou, C., Callebaut, P., Escribano, J. M., and Enjuanes, L. (1990). Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* 174, 410-417.
- Suñé, C., Jiménez, G., Correa, I., Bullido, M. J., Gebauer, F., Smerdou, C., and Enjuanes, L. (1990). Mechanisms of transmissible gastroenteritis corona virus neutralization. *Virology* 177, 559-569.