

LA INMUNIZACIÓN CON ADN: ¿UNA NUEVA GENERACIÓN DE VACUNAS?

Orlando L Pardo

División Vacunas, CIGB, Apdo. 6162, C.P. 10600, Ciudad de la Habana, Cuba.

ABSTRACT

In the last five years, it has been found that direct nucleic acid transfer into living organisms is a feasible approach to obtain expression levels that although are still far from being of any therapeutic value, are indeed enough to elicit in the host a significant immune response against the protein codified by the nucleic acid as such. This methodology of immunization has many advantages over more conventional ones, namely: the need of purifying proteins is obviated, as the expression occurs in the host cells the appropriate protein processing and conformation are guaranteed, and most pros of live (e.g. elicitation of an efficient cellular response) and subunit vaccines (e.g. high safety) are combined while most cons of both are avoided (e.g. elicitation of an immune response against the proteins of the specific live vector used). Therefore, although many questions on the topic still remain unanswered, the possibility of nucleic acid vaccines becoming a new generation of human vaccines belongs now to the near future.

Key words: DNA immunization, DNA vaccines, gene-transfer, plasmid DNA

Biotecnología Aplicada 1996;13:81-88

RESUMEN

En los últimos cinco años se ha logrado demostrar que la transferencia directa de ácidos nucleicos a organismos vivos genera niveles de expresión que si bien son aún de escaso valor terapéutico, son suficientes para despertar en el hospedero una respuesta inmune significativa contra la proteína codificada por el ácido nucleico en cuestión. Esta metodología de inmunización posee múltiples ventajas sobre las ya convencionales: se obvia la necesidad de purificar proteínas, la expresión en las propias células del hospedero garantiza una maduración y conformación adecuadas para la proteína de interés, y se combinan muchos aspectos positivos de las vacunas vivas (p.e. obtención de respuesta celular eficiente) con los de las vacunas de subunidades (p.e. alta seguridad), evitándose además muchos de los aspectos negativos de ambas (p.e. desencadenamiento de respuesta contra los antígenos propios del vector vivo empleado). Por consiguiente, y aunque aún existen muchas interrogantes abiertas al respecto, la posibilidad de que las vacunas de ácidos nucleicos se conviertan en una nueva generación de vacunas humanas pertenece ahora a un futuro no muy lejano.

Palabras claves: ADN plasmídico, transferencia genética, vacunas de ADN

Introducción

En enero de 1989, un grupo de científicos de la Universidad de Wisconsin (EE.UU.) dirigido por Jon Wolff, trabajaba en la verificación de una hipótesis elaborada pocos meses antes por el grupo de Philip Felgner en la compañía biotecnológica Vical Inc., de San Diego, California. La idea, en resumen, consistía en emplear los complejos electrostáticos que surgen entre el ADN y determinados lípidos catiónicos, como vehículo para lograr una transfección *in vivo* eficiente, que rindiera niveles de expresión de cierto valor terapéutico.

Para sorpresa de todos, en los animales usados como controles negativos (en los que sólo se administró ADN plasmídico en solución acuosa) los niveles de expresión del transgén en el músculo murino eran significativos también. Una vez comprobada la reproducibilidad de semejante hallazgo, la llamada tecnología de "transferencia directa de ADN desnudo" recién había nacido, lo cual despertó gran interés en toda la comunidad científica internacional.

Si bien era la primera vez que se demostraba expresión *in vivo* mediante la administración directa de ADN "desnudo", existían varios precedentes de "transferencia genética directa" desde los años ochenta, cuando la inyección intraperitoneal de ADN plasmídico coprecipitado con fosfato cálcico generó expresión detectable en varios órganos murinos (1). Poco antes, un intento similar había sugerido que sólo las moléculas replicativas serían capaces de persistir suficiente tiempo en el organismo en cuestión (2), y de hecho, era conocido que la inyección del ADN genómico de ciertos virus sí rendía transfecciones exitosas *in vivo*.

Asimismo, no sólo los complejos ADN lípidos, sino también los de ADN proteínas (entre otros sistemas más o menos sofisticados), se venían estudiando intensamente durante esos años con el objetivo común de desarrollar un vehículo efectivo para la transfección del ADN *in vivo*. Pero es sólo después del inusitado descubrimiento de los grupos de Wolff y Felgner (3), que se presta suficiente

atención a la posibilidad de lograr dicho objetivo sin necesidad de apelar a formulaciones especiales.

La presente revisión se concentra básicamente en los estudios desencadenados a raíz del mencionado descubrimiento, y está enfocada, como lo indica su título, hacia el campo de las vacunas, pero también se abordan otras aplicaciones no menos importantes que van siendo ensayadas con esta novel tecnología de "transferencia directa de ADN desnudo".

Estudios iniciales

Varios estudios fueron iniciados a partir de 1990 para dilucidar los aspectos básicos de la "transferencia directa de ADN desnudo", así como para establecer las condiciones óptimas en las que ésta se verificaba (3-22, revisado en 23). Los resultados más relevantes de estos primeros estudios pueden resumirse de la siguiente manera:

1. Mediante la inyección directa de ADN plasmídico puro en animales se obtiene expresión importante en el tejido muscular estriado (esquelético y cardíaco), pero apenas en otros órganos como son el cerebro, pulmón, estómago, bazo, útero y riñón (5). Esporádicamente se ha reportado expresión también en el hígado (24) y la glándula tiroidea (25).

2. La solución a inyectar requiere por lo general de cierta fuerza iónica (16), por ejemplo: NaCl 0,9 % p.v, prefiriéndose un pH cercano a la neutralidad, si bien la implantación quirúrgica de precipitados etanólicos del plásmido puro también resulta efectiva (4).

3. El número de fibras transfectadas, salvo en casos particulares, resulta inferior al 1 % del total que compone al músculo en cuestión, pero la expresión es detectable durante más de un año (15), especialmente cuando se emplean promotores virales "promiscuos" como el inmediato-temprano del citomegalovirus humano.

4. La presencia física del plásmido en el tejido muscular, al igual que su expresión, es detectable durante varios meses (15), a pesar de que la mayor parte tiende a ser degradado rápidamente, y de que no hay evidencias de su integración ni de su replicación en el ambiente [posmitótico] de las fibras musculares (15). La forma superenrollada del plásmido resulta 20-100 veces más eficiente que la lineal (15), lo cual pudiera estar relacionado con una mayor resistencia a la degradación o con el mecanismo, aún desconocido, de entrada a la célula.

5. En muy pocos casos la inyección del plásmido provoca infiltración de células mononucleares al tejido muscular (17), y también es limitado el número de fibras dañadas por esta técnica.

6. En el modelo murino, se considera que la dosis "saturante" de plásmido es inferior a 50 µg (16), y si bien es recomendable inyectar durante las semanas de rápido crecimiento (12), se ha verificado expresión en casi todas las edades del animal. Entre las especies donde inicialmente también se de-

mostró expresión mediante la inyección de ADN plasmídico se incluyen carpas, pollos, perros, gatos, puercos, hamsters y conejos.

7. Por último, las moléculas de ARN transcritas y procesadas apropiadamente *in vitro* también generan expresión detectable por esta técnica, pero mucho más transiente que la generada por el ADN plasmídico (3).

De todas las generalizaciones aportadas por los estudios iniciales referidos arriba (3-23), quedaba claro que la tecnología de "transferencia directa de ADN desnudo" era una realidad que podría revolucionar los protocolos convencionales de terapia génica, especialmente los diseñados para combatir miopatías primarias como la distrofia muscular de Duchenne, entre otras, y en este sentido se comenzó a investigar (8).

La inmunización con ADN

Al margen de las posibles aplicaciones terapéuticas de la "transferencia directa de ADN desnudo", quedaba otro campo aún sin explorar: ¿sería posible generar una respuesta inmune en el hospedero al transferirle genes heterólogos? ¿Cuán efectiva resultaría dicha respuesta para protegerlo contra un patógeno específico?

En 1992, De-chu Tang y colaboradores en la Universidad de Texas (EE.UU.), responden afirmativamente la primera de las interrogantes anteriores al detectar anticuerpos en ratones inoculados con los genes de la hormona del crecimiento y/o la antitripsina- α 1 humanas, si bien la técnica empleada en este caso no fue la inyección intramuscular, sino la proyección intradérmica de micropartículas de oro recubiertas superficialmente con los plásmidos en cuestión (26). Esta variante de administración *in vivo* del ADN plasmídico será abordada con algún detalle más adelante. En el mismo reporte (26), se notó una evidente respuesta secundaria al inmunizar más de una vez los animales, pudiéndose detectar los anticuerpos durante al menos cinco meses.

A partir de entonces, numerosos grupos científicos interesados en generar inmunidad protectora contra determinados patógenos (especialmente intracelulares), decidieron ensayar la inmunización con ADN para determinar si las respuestas inmunes obtenidas mediante esta técnica tenían algún significado biológico (revisado en 27-32). De ser así, podrían compararse los resultados de esta incipiente tecnología con los alcanzados mediante las ya convencionales (inmunización con proteínas puras, microorganismos inactivados o atenuados, etc.).

Un patógeno en el que se comenzó a trabajar con gran intensidad fue el virus de la influenza humana (33-43, revisado en 44) empleando como modelos animales ratones, pollos, y más recientemente, hurones.

Los resultados positivos obtenidos han superado con toda seguridad cualquier vaticinio preliminar. En el modelo murino, en varios casos se generaron títulos discretos de anticuerpos contra la hemaglutinina (HA) y la nucleocápsida (NP), los que resultaron capaces de inhibir la hemaglutinación viral e incluso neutralizar el virus *in vitro*. Se generó, además, respuesta citotóxica de amplio espectro contra NP, la cual fue detectable aún al año de la inmunización (38, 42). Pero lo que resulta más importante: en dependencia de la dosis de ADN y la vía de inmunización empleada, hasta un 95 % de los ratones inmunizados quedaron protegidos contra un reto letal del virus de la influenza (33-35, 40).

Los estudios realizados con este ortomixovirus no sólo demuestran que las vacunas de ADN resultan de hecho efectivas, sino que han modificado en gran medida los conocimientos iniciales ya mencionados sobre "la transferencia directa de ADN desnudo".

Por ejemplo, además de la vía intramuscular de inmunización, la intravenosa (35) y la intradérmica (35, 42) también generan respuestas inmunes importantes. Asimismo, en ratones la dosis de ADN plasmídico puede ser tan poca como 1 µg (40), y si se emplea la variante de los microproyectiles intradérmicos, mucho menor aún (35).

Otro importante patógeno abordado por la inmunización con ADN es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (45-53). En este caso, se han obtenido anticuerpos contra epítopes relevantes de las glicoproteínas gp120 y gp41 en ratones y primates no humanos. Estos anticuerpos neutralizan *in vitro* al virus, inhiben la formación de sincisio por el mismo, e interfieren parcialmente la unión de gp120 con su receptor celular (45, 46).

Además, también se genera respuesta citotóxica contra las proteínas gp160 y gp120 de este retrovirus, la cual tiende a anteceder la aparición de los anticuerpos (47), y resulta suficiente para proteger a más del 90 % de los ratones inmunizados de un reto letal con células tumorales transfectadas con la gp160 del propio VIH-1 (48).

Un resumen de los principales patógenos donde se ha aplicado (con mayor o menor éxito) la inmunización con ADN, aparece en la Tabla 1; también se han iniciado estudios con los genes de las proteínas gB de citomegalovirus, porinas de *Salmonella typhi*, y varios antígenos flavivirales, entre otros.

Vías Alternativas

Además de la inyección intramuscular en solución salina fisiológica, se han desarrollado varias vías alternativas de inmunización, algunas de las cuales ya han demostrado ser superiores a la primera. A continuación se describen brevemente estas vías alternativas. También aparecen relacionadas, en aras de brindar un cuadro más completo, algunas estrategias "directas" de inmunización con ADN que

no lo emplean "desnudo" exactamente, sino conjugado a otras moléculas. Estas estrategias persiguen, en última instancia, lograr una transfección más eficiente *in vivo*, o dirigir específicamente la expresión a determinado tejido de interés que no sea el muscular estriado.

Cañón de micropartículas

En la sección anterior se mencionó el empleo de los microproyectiles intradérmicos, primero como reporte original de la obtención de anticuerpos al inmunizar con ADN (26), y ya luego aplicado al caso específico del virus de la influenza humana (35).

Esta variante de administración hace uso de un "cañón" capaz de propulsar las micropartículas recubiertas con el ADN en cuestión a través de varias capas celulares del tejido a transfectar, bien sea este un órgano quirúrgicamente expuesto, o simplemente la piel (54-56).

La expresión de los genes transferidos mediante esta técnica, al igual que con la inyección directa, se ha demostrado en múltiples especies de animales (ratón, rata, hámster, conejo y mono rhesus), pero distintivamente, la misma no se limita sólo al músculo estriado, sino que es detectable también en epidermis, dermis, hígado, riñón, páncreas y, algo menos, en corazón, bazo y músculos abdominales (22).

Con dosis tan bajas como 15 ng de ADN ya es posible obtener una respuesta biológica eficiente (57), lo que es atribuible no sólo a la alta efectividad en la entrega intracelular del ADN, sino también a la posibilidad de transfectar tejidos más inmuno-competentes que el músculo (58).

Propulsor de fluidos

El principio de funcionamiento es la proyección con alta presión de la solución donde se halla disuelto el ADN. Este procedimiento ha sido empleado con anterioridad para la vacunación convencional en humanos.

Al parecer no resulta tan eficaz como el "cañón" de micropartículas, pero el mero hecho de no introducir tales partículas metálicas en el organismo, lo hace muy atractivo para una presunta inmunización con ADN en seres humanos. Además, esta técnica mantiene la ventaja de permitir expresión no sólo en el músculo estriado, sino también en piel, tejido adiposo y glándulas mamarias (59, 60), lo cual genera respuestas humorales y celulares significativas (61).

Complejos ADN lípidos (30, 62)

Si bien la inyección intramuscular directa de complejos ADN lípidos no rinde ventajas significativas sobre el ADN "desnudo", por vía intravenosa sí se obtiene con ellos una expresión importante en músculo, así como en muchos otros tejidos y órganos: pulmón, riñón, hígado, bazo, timo, médula ósea, endotelio vascular, útero, páncreas e intestino. Sin embargo, la expresión en estos tejidos resulta, por

lo general, menos duradera que en el músculo, aunque en ratones también se ha reportado la transferencia y expresión de dichos complejos en los fetos y proge nie neonata de hembras inmunizadas (63).

Complejos ADN proteínas (64-66)

Se han empleado múltiples variantes de complejos ADN proteínas. La elección de la proteína (transferrina, insulina, asialoglico-proteínas, etc.) se basa en la presencia de los receptores celulares específicos en el tejido a transfectar (66). Además, también se han desarrollado complejos más sofisticados que incluyen partículas adenovirales no replicativas, con el objetivo de favorecer el escape endosomal una vez endocitado el complejo (65).

Otras Aplicaciones

Las aplicaciones de la "transferencia directa de genes" no se reducen a generar inmunidad contra agentes infecciosos, sino que, mediante la transferencia de los genes codificantes para las proteínas del sistema principal de histocompatibilidad (67-72), múltiples linfoquinas (73-76), regiones variables de inmunoglobulinas (77), el receptor de las células T (78) así como las moléculas de diferenciación CD4 y CD8 (79), ya se ha comenzado a manipular *in vivo* el sistema inmune de una forma mucho más práctica que las disponibles por las metodologías convencionales.

Los resultados obtenidos en este campo son también muy alentadores, como lo indican los ejemplos citados a continuación:

1. En ratones, la transferencia intramuscular de los genes de IL2, IL4 y GM-CSF adyuva la respuesta humoral que estos animales desarrollan contra un antígeno determinado, mientras que la transferencia de los genes de TGF- β 1 y IFN- γ la suprimen (73, 76). Asimismo, la administración intravenosa de los genes del propio TGF- β 1 y de PDGF B, provoca marcados efectos biológicos en el tejido endotelial transfectado (75, 80).

2. Se han iniciado estudios con los genes codificantes para la cadena de receptores de células T "patogénicos" (provenientes de tejidos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide), y es posible generar respuesta humoral contra esa proteína en ratones (78), lo cual pudiera tener importancia terapéutica de verificarse en humanos.

3. Varios esquemas de inmunización con ADN plasmídico se han realizado en animales para generar una respuesta inmune protectora antitumoral. Los transgenes por excelencia han resultado ser las moléculas del sistema principal de histocompatibilidad tipo I (67, 68, 71, 72) (con el propósito de provocar un rechazo hacia las células tumorales transfectadas), si bien otros candidatos (como los antígenos T del virus SV40 y el antígeno carcinoembrionario) también han sido empleados (81).

Por lo general, en estos estudios el ADN se ha evaluado acompañado con lípidos catiónicos, buscando amplificar los efectos biológicos de la terapia (respuesta citotóxica antitumoral, regresión o progresión retardada del tumor, etc.), pero en solución salina fisiológica también se desata una respuesta inmune en el animal vacunado (69, 70).

Es precisamente en patologías incurables por la medicina actual, donde la "transferencia directa de ADN" ha sido aplicada en seres humanos por primera vez. Varios estudios clínicos de fase I y II, que involucran en total a decenas de pacientes de cáncer, han sido realizados o están en desarrollo en EE.UU. (82).

En estos estudios, los parámetros seguidos más rigurosamente han sido la toxicidad de la formulación, la aparición de síntomas de autoinmunidad y por supuesto, la cuantificación y localización tanto de la proteína foránea como del plásmido que la codifica. Aún es muy temprano para emitir veredicto alguno sobre los efectos biológicos de la terapia, si se toma en cuenta que las vías de inoculación, formulaciones y dosis aún están siendo optimizadas.

Por último, no debe omitirse aquí la mención de dos aplicaciones muy recientes de la inmunización con ADN, y que resultan no menos espectaculares:

1. El empleo de determinadas bacterias transformadas con el plásmido de interés como vehículo vivo para su entrega a nivel de las mucosas (83).

2. La inmunización directa con bibliotecas genómicas de determinados patógenos, como metodología de identificación de los antígenos protectores contra ellos (84).

Bioseguridad y Regulaciones

Tres consecuencias negativas que en principio podrían derivarse de la inmunización con ADN son:

1. La aparición de anticuerpos contra el ADN inyectado pudiera generar estados autoinmunes reminiscentes de los que se presentan, por ejemplo, en el lupus eritematoso sistémico.

2. La integración genómica al azar del ADN inyectado pudiera activar un oncogén, inactivar genes supresores de oncogenes, etc.

3. La expresión continua de "bajos" niveles del antígeno, y su presentación al sistema inmune por largos periodos, pudiera generar estados de tolerancia, hiperinmunidad, etc.

El primero de estos puntos es tal vez el menos preocupante de los tres, ya que durante años se conoce la escasa inmunogenicidad de la conformación B (más usual) del ADN, especialmente libre en solución. La obtención de anticuerpos contra el ADN B se logra mediante su conjugación a proteínas inmunogénicas. Además, de los anticuerpos contra el ADN doblecatenario, solamente aquellos de alta afinidad que posean aminoácidos básicos en sus paratopos resultan realmente patogénicos, al de-

Tabla 1. Principales patógenos contra los que se ha aplicado la inmunización con ADN.

PÁTÓGENO	COMENTARIOS	REFERENCIAS
Herpesvirus bovino 1	Anticuerpos murinos contra gI, gIII, y gIV, estos últimos neutralizantes. La inmunización de terneros con el gen de gIV confiere protección parcial.	(92)
Virus de las hepatitis B y C	Anticuerpos murinos contra proteínas químéricas NP (del VHC) y preS2-S o S (del VHB). También en ratas y conejos se han generado anticuerpos contra S, y se ha detectado respuesta citotóxica en ratones contra la NP del VHC.	(93-101, 102)
Virus de la coriomeningitis linfocítica	Escasos anticuerpos murinos contra la NP o GP, pero sensibilización de linfocitos citotóxicos <i>in vivo</i> y 50 % de protección (en ocasiones inmunoamplificación).	(103-105)
Virus de la rabia	Obtención de anticuerpos murinos neutralizantes y respuesta citotóxica contra gG, así como inmunidad protectora, detectándose adyuvación o supresión mediante la coinoculación de plásmidos codificantes para GM-CSF o IFN- γ , respectivamente.	(106, 107, 76)
Micobacterias	La inmunización de ratones con el gen de HSP65 de <i>M. leprae</i> rinde menores bacteremias hepáticas tras un reto con <i>M. tuberculosis</i> . También se estudian los genes de HSP65, 85A, 85B y 85C de <i>M. tuberculosis</i> .	(108)
<i>Leishmania major</i>	La inmunización de ratones con el gen de gp63 de <i>L. major</i> confiere protección parcial.	(109, 110)
<i>Plasmodium yoelii</i>	Obtención de anticuerpos murinos contra el antígeno CSP de <i>P. yoelii</i> (los que <i>in vitro</i> inhiben parcialmente la invasión microbiana a hepatocitos), así como respuesta citotóxica y protección parcial.	(111-114)
Virus herpes simplex	Anticuerpos murinos contra gB de HSV-1 poco neutralizantes, pero 80 % de protección. También anticuerpos neutralizantes contra gD de HSV-2.	(115, 116, 117)
<i>Schistosoma japonicum</i>	Anticuerpos murinos contra Sj97, no así contra Sj26.	(118)
<i>Mycoplasma pulmonis</i>	Anticuerpos murinos y respuesta citotóxica contra determinados antígenos.	(119, 84)
<i>Cryptosporidium parvum</i>	La inmunización de ovejas con el gen de CP15/60 genera anticuerpos en suero y calostro.	(120)
Papilomavirus	La inmunización con el gen de L1 en conejos generó anticuerpos neutralizantes y protectores.	(121)

positarse fundamentalmente en la membrana basal de los glomérulos (85). Por último, en todos los esquemas de inmunización con ADN donde se han buscado anticuerpos anti-ADN, éstos nunca se han detectado (14).

Los otros dos aspectos son de mayor significación, y a su vez, mucho más difíciles de monitorear *in vivo*.

Los plásmidos que se emplean para la inmunización no poseen regiones reportadas como orígenes de replicación en células eucarióticas, ni tampoco secuencias homólogas promotoras de eventos recombinativos-integrativos (exceptuando los casos donde el gen a transferir es homólogo). Además, nunca se ha logrado detectar esos eventos experimentalmente (15), si bien es imposible aún excluir su ocurrencia al azar con muy baja frecuencia.

Tampoco se han detectado síntomas de tolerancia o hiperinmunidad en los animales inmunizados con ADN, ni ningún tipo de trastorno autoinmune degenerativo. Pero, obviamente, muchos experimentos controlados han de ser diseñados aún antes de que la última palabra sobre tan delicado aspecto sea dicha.

Tal vez una alternativa que aún no haya sido apreciada a cabalidad sea el empleo del ARN en lugar del ADN. De hecho, ya se han comenzado a desarrollar sistemas replicativos de ARN capaces de rendir expresiones suficientemente estables como para generar respuestas inmunes significativas (86, 87).

Conclusiones

¿Cuánto habrá que esperar para la aplicación en seres humanos de una vacuna de ADN? La respuesta depende de los conocimientos que sumi-nistren los estudios mencionados arriba. También depende del patógeno específico contra el que se pretenda proteger. Por ejemplo, en el caso del HIV-1 (incurable por la ciencia actual) algunas compañías norteamericanas ya han obtenido la autorización oficial para realizar experimentos de inmunización con ADN en seres humanos.

Los controles que habrán de realizarse preliminarmente, así como las regulaciones que regirán la presunta aplicación en humanos de la primera vacuna de ADN, recién comienzan a ser discutidos (88,

89, 90, 91), y ya se han celebrado varios eventos internacionales de gran prestigio para abordar el tema de las vacunas de ADN, como los sostenidos en Ginebra (Suiza) en mayo '94, en Arlington (EE.UU.) en abril '95, y en Bethesda (EE.UU.) en febrero '95 y '96.

Son muchos los argumentos emitidos por la comunidad científica internacional fuera y dentro de estos eventos, tanto a favor como en contra de una posible vacunación con ADN en seres humanos. Muchas son las interrogantes que se han

abierto, y muchas serán las que surjan en la medida que las primeras encuentren respuesta en los resultados experimentales que vayan obteniéndose.

Por hoy, nos basta con saber que la inmunización con ácidos nucleicos "desnudos" es ya una alternativa real que va abriéndose camino paulatinamente como forma práctica de manipulación del sistema inmune. Para mañana nos queda la gran incertidumbre de si esta técnica llegará a convertirse o no en una nueva generación de vacunas humanas.

1. Benvenisty N and Reshef L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes. *PNAS USA* 1986;83:9551-9555.
2. Dubensky TW, Campbell BA and Villarreal LP. Direct transfection of viral and plasmid DNA into the liver or spleen of mice. *PNAS USA* 1984;81:7529-7533.
3. Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990;247:1465-1468.
4. Wolff JA, Williams P, Acsadi G, Jiao A, Jani A and Chong W. Conditions affecting direct gene transfer into rodent muscle *in vivo*. *Biotechniques* 1991;11:474-485.
5. Acsadi G, Jiao S, Jani A, Duke D, Williams P, Chong W, et al. Direct gene transfer and expression into rat heart *in vivo*. *New Biologist* 1991;3:71-81.
6. Hansen E, Fernandes K, Goldspink G, Butterworth P, Umeda PK and Chang K. Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS Lett* 1991;290:73-76.
7. Kitsis RN, Buttrick PM, McNally EM, Kaplan ML and Leinwand LA. Hormonal modulation of a gene injected into rat heart *in vivo*. *PNAS USA* 1991;88:4138-4142.
8. Acsadi G, Dickson G, Love DR, Jani A, Walsh FS, Gurusinghe A, et al. Human dystrophin expression in mdx-mice after intramuscular injection of DNA constructs. *Nature* 1991;352:815-818.
9. Leinwand LA and Leiden JM. Gene transfer into cardiac myocytes *in vivo*. *Trends Cardiovasc Med* 1991;1:271-276.
10. Lin H, Parmacek MS, Morle G, Bolling S and Leiden JM. Expression of recombinant genes in myocardium *in vivo* after direct injection of DNA. *Circulation* 1990;82:2217-2221.
11. Danko I, Fritz JD, Jiao S, Hogan K, Latendresse JS and Wolff JA. Pharmacological enhancement of *in vivo* foreign gene expression in muscle. *Gene Ther* 1994;1:114-121.
12. Walls DJ and Goldspink G. Age and sex influence expression of plasmid DNA directly injected into mouse skeletal muscle. *FEBS Lett* 1992;306:203-205.
13. Buttrick PM, Kass A, Kitsis RN, Kaplan ML and Leinwand LA. Behavior of genes directly injected into rat heart *in vivo*. *Circ Res* 1992;70:193-198.
14. Jiao S, Williams P, Berg RK, Hodgeman BA, Liu L, Repetto G, et al. Direct gene transfer into nonhuman primate myofibers *in vivo*. *Hum Gene Ther* 1992;3:21-33.
15. Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P and Jani A. Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle. *Hum Mol Gen* 1992;1:363-369.
16. Manthorpe M, Jensen FC, Hartikka J, Felgner J, Rundell A, Margalith M, et al. Gene therapy by intramuscular injection of plasmid DNA: studies on firefly luciferase gene expression in mice. *Hum Gene Ther* 1993;4:419-431.
17. Davis HL, Demeneix BA, Quantin B, Coulombe J and Whalen RG. Plasmid DNA is superior to viral vectors for direct gene transfer into adult mouse skeletal muscle. *Hum Gene Ther* 1993;4:733-740.
18. Davis HL, Whalen RG and Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vitro*: factors influencing efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 1993;4:151-159.
19. Davis HL and Jasmin BJ. Direct gene transfer into mouse diaphragm. *FEBS Lett* 1993;333:146-150.
20. Wolff JA, Dowty ME, Jiao S, Repetto G, Berg RK, Ludtke JJ, et al. Expression of naked plasmids by cultured myotubes and entry of plasmids into T tubules and caveolae of mammalian skeletal muscle. *J Cell Sci* 1992;103:1249-1259.
21. Neckers LM. Cellular internalization of oligodeoxynucleotides. *Gene Therapeutics: methods and applications of direct gene transfer*. (Ed. por JA Wolff). Birkhäuser, Boston 1994;180-192.
22. Cheng L, Ziegelhoffer PR and Yang NS. *In vivo* promoter activity and transgene expression in mammalian somatic tissues evaluated by using particle bombardment. *PNAS USA* 1993;90:4455-4459.
23. Danko I and Wolff JA. Direct gene transfer in muscle. *Vaccine* 1994;12:1499-1502.
24. Malone RW, Hickman MA, Lehmann K, Walzem R, Bassiri M and Powell JS. Hepatic gene transfer following direct *in vivo* injection. *J Cell Biochem* 1993;17E:239.
25. Sikes ML, O'Malley Jr BW and Ledley FD. *In vivo* gene transfer into rabbit thyroid by direct DNA injection: a novel strategy for gene therapy. *J Cell Biochem* 1993;17E:208.
26. Tang DC, De Vit M and Johnston SA. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 1992;356:152-154.
27. Ulmer JB. Polynucleotide vaccines. *Curr Opin Invest Drugs* 1993;2:983-989.
28. Braciale TJ. Naked DNA and vaccine design. *Trends in Microb* 1993;1:323-325.
29. Waine GJ and McManus DP. Nucleic acids: vaccines of the future. *Parasitol Today* 1995;11:113-116.
30. Herweijer H, Fritz JD, Hagstrom JE and Wolff JA. Direct gene transfer *in vivo*. Somatic gene therapy CRC Press, Inc 1995;183-202.
31. Donnelly JJ, Ulmer JB and Liu MA. Immunization with DNA. *J Immunol Meths* 1994;176:145-152.
32. Pardoll DM and Beckerleg AM. Exposing the immunology of naked DNA vaccines. *Immunity* 1995;3:165-169.
33. Ulmer JB, Donnelly JJ, Parker SE, Rhodes GH, Felgner PL, Dwarki VJ, et al. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 1993;259:1745-1749.
34. Montgomery DL, Shiver JW, Leander KR, Perry HC, Friedman A, Martinez D, et al. Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol* 1993;12:777-783.
35. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC and Robinson HL. DNA vaccines: protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *PNAS USA* 1993;90:11478-11482.
36. Eisenbraun MD, Fuller DH and Haynes JR. Examination of parameters affecting the elicitation of humoral immune responses by particle bombardment-mediated genetic immunization. *DNA Cell Biol* 1993;12:791-797.
37. Robinson HL, Hunt LA and Webster RG. Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* 1993;11:957-960.
38. Yankaukas MA, Morrow JE, Parker SE, Abai A, Rhodes GH, Dwarki VJ, et al. Long-term anti-nucleoprotein cellular and humoral immunity is induced by intramuscular injection of plasmid DNA containing NP gene. *DNA Cell Biol* 1993;12:771-776.
39. Fynan EF, Robinson HL and Webster RG. Use of DNA encoding influenza haemagglutinin as an avian influenza vaccine. *DNA Cell Biol* 1993;12:785-789.
40. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, Friedman A, Donnelly JJ and Liu MA. Protective immunity by intramuscular injection of low doses of influenza virus DNA vaccines. *Vaccine* 1994;12:1541-1544.
41. Webster RG, Fynan EF, Santoro JC and Robinson H. Protection of ferrets against influenza challenge with a DNA vaccine to the haemagglutinin. *Vaccine* 1994;12:1495-1498.
42. Raz E, Carson DA and Parker SE. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *PNAS USA* 1994;91:9519-9523.
43. Donnelly JJ, Friedman A, Martínez D, Montgomery DL, Shiver JW, Motzel SL, et al. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nature Med* 1995;1:583-587.
44. Fynan E, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC and Robinson HL. DNA vaccines: a novel approach to immunization. *Int J Immunopharmac* 1995;17:79-83.
45. Wang B, Ugen KE, Srikantan V, Agadjanyan MG, Dnag K, Refaeli Y, et al. Gene inoculation generates immune responses against human immunodeficiency virus type 1. *PNAS USA* 1993;90:4156-4160.
46. Wang B, Boyer J, Srikantan V, Coney L, Carrano R, Phan C, et al. DNA inoculation induces neutralizing immune responses against human immunodeficiency virus type 1 in mice and nonhuman primates. *DNA Cell Biol* 1993;12:799-805.
47. Fuller DH and Haynes JR. A qualitative progression in HIV type 1 glycoprotein 120-specific cytotoxic cellular and humoral immune responses in mice receiving a DNA-based glycoprotein 120 vaccine. *AIDS Res & Hum Retrov* 1994;10:1433-1441.

48. Wang B, Merva M, Dang K, Ugen K, Boyer J, Williams WV, et al. DNA inoculation induces protective *in vivo* immune responses against cellular challenge with HIV-1 antigen-expressing cells. *AIDS Res & Hum Retrov* 1994;10:S35-S41.
49. Haynes JR, Fuller DH, Eisenbraun MD, Ford MJ and Perlmutter TM. Accell[®] particle-mediated DNA immunization elicits humoral, cytotoxic, and protective immune responses. *AIDS Res & Hum Retrov* 1994;10:S43-S45.
50. Coney L, Wang B, Ugen KE, Boyer J, McCallus D, Srikanthan V, et al. Facilitated DNA inoculation induces anti-HIV-1 immunity *in vivo*. *Vaccine* 1994;12:1545-1550.
51. Ugen KE. DNA inoculation as a novel vaccination method against human retroviruses with rheumatic disease associations. *Immunol Res* 1994;13:154-162.
52. Wang B, Boyer J, Srikanthan V, Ugen K, Gilbert L, Phan C, et al. Induction of humoral and cellular immune responses to the human immunodeficiency type 1 virus in nonhuman primates by *in vivo* DNA inoculation. *Viol* 1995;211:102-112.
53. Okuda K, Bukawa H, Hamajima K, Kawamoto S, Sekigawa KI, Yamada Y, et al. Induction of potent humoral and cell-mediated immune responses following direct injection of DNA encoding the HIV type 1 env and rev gene products. *AIDS Res & Hum Retrov* 1995;11:933-943.
54. Johnston SA and Tang DC. The use of microparticle injection to introduce genes into animal cells *in vitro* and *in vivo*. *Genetic Engineering* (Ed. por JK Setlow) Plenum Press, NY 1993;15:225-236.
55. Johnston SA and Tang DC. Gene gun transfection of animal cells and genetic immunization. *Meths Cell Biol* 1994;43:353-365.
56. Yang NS, De Luna C and Cheng L. Gene transfer via particle bombardment: applications of the Accell gene gun. *Gene Therapeutics: methods and applications of direct gene transfer*. (Ed. by JA Wolff) Birkhäuser, Boston 1994;193-209.
57. Perlmutter TM, Eisenbraun MD, McCabe D, Prayaga SK, Fuller DF and Haynes JR. Gene gun-based nucleic acid immunization: Elicitation of humoral and cytotoxic T lymphocyte responses following epidermal delivery of nanogram quantities of DNA. *Vaccine* 1995;13:1427-1430.
58. Holthfeld R and Engel AG. The immunobiology of muscle. *Immunol Today* 1994;15:269-274.
59. Furth PA, Shamay A, Wall RJ and Hennighausen L. Gene transfer into somatic tissues by jet injection. *Anal Biochem* 1992;205:365-368.
60. Furth PA, Shamay A and Hennighausen L. Gene transfer into mammalian cells by jet injection. *Hybridoma* 1995;14:149-152.
61. Vahlsing HL, Yankaukas MA, Sawdey M, Gromkowski SH and Manthorpe, M. Immunization with plasmid DNA using a pneumatic gun. *J Immunol Meths* 1994;175:11-22.
62. Singhal A and Huang L. Gene transfer in mammalian cells using liposomes as carriers. *Gene therapeutics: methods and applications of direct gene transfer*. (Ed. por JA Wolff) Birkhäuser, Boston 1994;118-142.
63. Tsukamoto M, Ochiya T, Yoshida S, Sugimura T and Terada M. Gene transfer and expression in progeny after intravenous DNA injection into pregnant mice. *Nat Genet* 1995;9:243-248.
64. Findeis MA, Merwin JR, Spitalny GL and Chiou HC. Targeted delivery of DNA for gene therapy via receptors. *Trends in Biotech* 1993;11:202-205.
65. Michael SI and Curiel DT. Strategies to achieve targeted gene delivery via the receptor-mediated endocytosis pathway. *Gene Ther* 1994;1:223-232.
66. Perales JC, Ferkol T, Molas M and Hanson RW. An evaluation of receptor-mediated gene transfer using synthetic DNA-ligand complexes. *Eur J Biochem* 1994;226:255-266.
67. Plautz GE, Yang ZY, Wu B, Gao X, Huang L and Nabel GJ. Immunotherapy of malignancy by *in vivo* gene transfer into tumors. *PNAS USA* 1993;90:4645-4649.
68. Nabel GJ, Nabel EG, Yang ZY, Fox BA, Plautz GE, Gao X, et al. Direct gene transfer with DNA liposome complexes in melanoma: expression, biologic activity, and lack of toxicity in humans. *PNAS USA* 1993;90:11307-11311.
69. Geissler EK, Wang J, Fechner JHJ, Burlingham WJ and Knechtle SJ. Immunity to MHC class I antigen after direct DNA transfer into skeletal muscle. *J Immunol* 1994;152:413-421.
70. Vile RG and Hart IR. *In vitro* and *in vivo* targeting of gene expression to melanoma cells. *Cancer Res* 1993;53:962.
71. Lew D, Parker SE, Latimer T, Abai AM, Kuwahara-Rundell A, Doh SG, et al. Cancer therapy using plasmid DNA: pharmacokinetic study of DNA following injection in mice. *Hum Gene Ther* 1995;6:553-564.
72. Parker SE, Vahlsing HL, Serfilippi LM, Franklin CL, Doh SG, Gromkowski SH, et al. Cancer gene therapy using plasmid DNA: safety evaluation in rodents and non-human primates. *Hum Gene Ther* 1995;6:575-590.
73. Raz E, Watanabe A, Baird SM, Eisenberg RA, Parr TB, Lotz M, et al. Systemic immunological effects of cytokine genes injected into skeletal muscle. *PNAS USA* 1993;90:4523-4527.
74. Hengge UR. Cytokine gene expression in epidermis with biological effects following injection of naked DNA. *Nature Genet* 1995;10:161-166.
75. Nabel EG, Liptay S, Yang Z, Gordon D, Haudenschild C and Nabel GJ. Recombinant platelet-derived growth factor β gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia *in vivo*. *J Clin Invest* 1993;91:1822-1829.
76. Xiang ZQ and Ertl HCJ. Manipulation of the immune response to a plasmid-encoded viral antigen by coinoculation with plasmids expressing cytokines. *Immunity* 1995;2:129-135.
77. Watanabe A, Raz E, Kohsaka H, Tighe H, Baird SM and Kipps TJ. Induction of antibodies to a V region by gene immunization. *J Immunol* 1993;151:2871-2876.
78. Williams WV, Fang Q, von Feldt JM, Boyer JD, Luchi M, Wang B, et al. Immunotherapeutic strategies targeting rheumatoid synovial T-cell receptors by DNA inoculation. *Immunol Res* 1994;13:145-153.
79. Wang B, Merva M, Dang K, Ugen KE, Williams W and Weiner DB. Immunization by direct DNA inoculation induces rejection of tumor cell challenge. *Hum Gene Ther* 1995;6:407-418.
80. Nabel EG, Yang Z, Plautz G, Forough R, Zhan X, Haudenschild CC, et al. Recombinant fibroblast growth factor-1 gene expression in porcine arteries induced intimal hyperplasia and angiogenesis *in vivo*. *Nature* 1992;362:844-846.
81. Conry RM. A carcinoembryonic antigen polynucleotide vaccine has *in vivo* antitumor activity. *Gene Ther* 1995;2:59-65.
82. Norman JA, Parker S, Lew D, Manthorpe M and Marquet M. Preclinical pharmacokinetics, manufacturing, and safety studies supporting a multicenter cancer gene therapy trial. *Hum Gene Ther* 1995;6:549-550.
83. Sizemore DR, Branstrom AA and Sadoff JC. Attenuated *Shigella* as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Science* 1995;270:299-302.
84. Barry MA, Lai WC and Johnston SA. Protection against mycoplasma infection using expression-library immunization. *Nature* 1995;377:632-635.
85. Stollar BD. Molecular analysis of anti-DNA antibodies. *FASEB J* 1994;8:337-342.
86. Herweijer H. A plasmid-based self-amplifying Sindbis virus vector. *Hum Gene Ther* 1995;6:1161-1167.
87. Zhou X, Berglund P, Rhodes G, Parker SE, Jondal M and Liljeström P. Self-replicating Semliki Forest virus RNA as recombinant vaccine. *Vaccine* 1994;12:1510-1514.
88. Smith HA. Regulatory considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* 1994;12:1515-1519.
89. Robertson JS. Safety considerations for nucleic acid vaccines. *Vaccine* 1994;12:1526-1528.
90. Pisetsky DS. Immunologic consequences of nucleic acid therapy. *Antisense Res Dev* 1995;5:219-225.
91. Ledley FD. Nonviral gene therapy: The promise of genes as pharmaceutical products. *Hum Gene Ther* 1995;6:1129-1144.
92. Cox GJM, Zamb TJ and Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1: immune responses in mice and cattle injected with plasmid DNA. *J Virol* 1993;67:5664-5667.
93. Major ME, Vitvitski L, Mink MA, Schleeff M, Whalen RG, Trepo C, et al. DNA-based immunization with chimeric vectors for the induction of immune responses against the hepatitis C virus nucleocapsid. *J Virol* 1995;69:5798-5805.
94. Lagging LM, Meyer K, Hoff D, Houghton M, Belshe RB and Ray R. Immune responses to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1995;69:5859-5863.
95. Michel ML. DNA mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects of the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *PNAS USA* 1995;92:5307-5311.
96. Davis HL, Michel ML, Mancini M, Schleeff M and Whalen RG. Direct gene transfer in skeletal muscle: plasmid DNA based immunization against the hepatitis B virus surface antigen. *Vaccine* 1994;12:1503-1509.
97. Davis HL, Michel ML and Whalen RG. DNA-based immunization for hepatitis B induces continuous secretion of antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Gen* 1993;2:1847-1851.
98. Whalen RG and Davis HL. DNA mediated immunization and the energetic immune response to hepatitis B surface antigen. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;75:1-12.
99. McDonnell WM. Gene transfer as a new mode of vaccination: implications for HCV. *Hepatology* 1993;8:696-702.
100. Michel ML. DNA mediated immunization. Prospects for hepatitis B vaccination. *Res Virol* 1995;146:261-265.
101. Schirmbeck R, Böhm W, Ando K, Chisari FV and Reimann J. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J Virol* 1995;69:5929-5934.
102. Schirmbeck R, Böhm W, Ando K, Chisari FV and Reimann J. Nucleic acid vaccination primes hepatitis B virus surface antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in nonresponder mice. *J Virol* 1995;69:5929-5934.
103. Martins LP, Lau LL, Asano MS and Ahmed R. DNA vaccination against persistent viral infection. *J Virol* 1995;69:2574-2582.
104. Yokoyama M, Zhang J and Whitton JL. DNA-immunization confers protection against lethal lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* 1995;69:2684-2688.

105. Zarozinski CC, Fynan EF, Selin LK, Robinson HL and Welsh RM. Protective CTL-dependent immunity and enhanced immunopathology in mice immunized by particle bombardment with DNA encoding an internal virion protein. *J Immunol* 1995;154:4010-4017.
106. Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J and Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994;199:132-140.
107. Xiang ZQ, Spitalnik SL, Cheng J, Erikson J, Wojczyk B and Ertl HC. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology* 1995;209:569-579.
108. Lowrie DB, Tascon RE, Colston MJ and Silva CL. Towards a DNA vaccine against tuberculosis. *Vaccine* 1994;12:1537-1540.
109. Xu D and Liew FY. Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 1994;12:1534-1536.
110. Xu D and Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein, gp63, of *L. major*. *Immunol* 1995;84:173-176.
111. Hoffman SL, Sedegah M and Hedstrom RC. Protection against malaria by immunization with a *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein nucleic acid vaccine. *Vaccine* 1994;12:1529-1533.
112. Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P and Hoffman SL. Protection against malaria by immunization with a plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *PNAS USA* 1994;91:9866-9870.
113. Hedstrom RC, Sedegah M and Hoffman SL. Prospects and strategies for development of DNA vaccines against malaria. *Res Immunol* 1994;145:476-483.
114. Mor G, Klinman DM, Shapiro S, Hagiwara E, Sedegah M, Norman JA, et al. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoelii* circumsporozoite protein plasmid DNA. *J Immunol* 1995;155:2039-2046.
115. Manickan E, Rouse RJD, Yu Z, Wire WS and Rouse BT. Genetic immunization against herpes simplex virus. Protection is mediated by CD4+ T lymphocytes. *J Immunol* 1995;155:259-265.
116. Rouse RJD, Nair SK, Lydy SL, Bowen JC and Rouse BT. Induction *in-vitro* of primary cytotoxic T-lymphocyte responses with DNA encoding herpes simplex virus proteins. *J Virol* 1994;68:5685-5689.
117. Ghiasi H, Cai S, Slanina S, Nesburn AB and Wechsler SL. Vaccination of mice with herpes simplex virus type 1 glycoprotein D DNA produces low levels of protection against lethal HSV-1 challenge. *Antivir Res* 1995;28:147-157.
118. Yang W, Waine GJ and Mcmanus DP. Antibodies to *Schistosoma japonicum* (Asian bloodfluke) paramyosin induced by nucleic acid vaccination. *Bioch Biophys Res Comm* 1995;212:1029-1039.
119. Lai WC. Protection against *Mycoplasma pulmonis* infection by genetic vaccination. *DNA Cell Biol* 1995;14:643-651.
120. Jenkins M, Kerr D, Fayer R and Wall R. Serum and colostrum antibody responses induced by jet-injection of sheep with DNA encoding a *Cryptosporidium parvum* antigen. *Vaccine* 1995;13:1658-1664.
121. Donnelly JJ. Protection against papillomavirus with a polynucleotide vaccine. *J Inf Dis* 1996; 173:314-320.