

VACUNAS DE ADN DESNUDO

MOISES SPITZ

Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Facultad de Medicina; Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires

Resumen Las vacunas génicas o de ADN desnudo, que aún se hallan en el campo experimental, constituyen el avance más importante en la historia de la vacunología. Los poderes inmunizantes y protectores que estas vacunas inducen están claramente establecidos, en ensayos preclínicos, en animales experimentales. Además se está estudiando su capacidad terapéutica. Se ha avanzado mucho en el conocimiento de las vías y los métodos de inmunización, pero aún se desconocen los mecanismos de transfección del plásmido y, lo que es muy importante, cuál o cuáles son las células transfectadas capaces de provocar en el vacunado, una respuesta a células citotóxicas y anticuerpos. Hay evidencias experimentales que afirman la importancia de los miocitos, los queratinocitos o las células dendríticas como factores principales de esta respuesta inmune. Otros experimentos sugieren dudas sobre cada uno de estos participantes. El objetivo de esta revisión es presentar el estado actual del conocimiento sobre los tipos de células que pueden ser transfectadas, que expresan el gen y presentan el antígeno vacunante en una respuesta inmune a ADN desnudo. Lo más probable es que no sea una y la misma célula, la transfectada y la que presenta el péptido inmunizante en MHC clase I y II. Un paso importante para el conocimiento del mecanismo de inmunización por ADN sería el esclarecimiento del mecanismo de transfección del plásmido de ADN bacteriano. ¿Habrá algún tipo celular con receptores específicos que incorporen el plásmido, lo expresen y transfieran su producto a las células presentadoras de antígeno?

Abstract *Naked DNA vaccines.* Although still in a developmental stage, naked DNA vaccines are already the most important advancement in the history of vaccinology. Both the injection of plasmid DNA in experimental animals by different routes and preclinical studies, demonstrate the induction of protective immunity against different pathogens. Therapeutic application of DNA vaccines are well under way. In spite of the growing understanding about methods and routes of immunisation, both the early mechanisms by which DNA dependent immunisation occurs as well as the transfecting cell types remain poorly understood. There is abundant experimental evidence that myocytes, keratinocytes and dendritic cells play an important role in the induction of the immune response. There is also an ongoing controversy on the relative importance of each one of these cell types. The aim of this paper is to review the current state of affairs regarding the understanding of the cell types participating in an immune response to the injection of a plasmid DNA vaccine. It is probably unlikely that only one and the same cell type would be the transfecting cell and the one presenting the immunising peptide on MHC class II and I. An important step towards the understanding of DNA immunising mechanisms would be to elucidate plasmid DNA transfection. Is there a cell type that has specific receptors capturing the plasmid, expressing it and transferring its products to the antigen-presenting cell?

Key words: vaccines, plasmid DNA, genetic immunisation

El objetivo de la vacunación preventiva es preparar al huésped de manera que ante la agresión de un microorganismo patógeno sea capaz de montar una reacción defensiva que evite la enfermedad.

La inyección parenteral de un plásmido de ADN desnudo, que tiene insertado un gen que codifica un péptido antigénico, induce, en el animal, una buena y duradera respuesta inmune. Así se han desarrollado vacunas ex-

perimentales contra un número de agentes patógenos incluyendo los causantes de malaria, influenza, rabia, herpes simplex, leishmaniasis, tuberculosis y muchos otros que afectan al reino animal¹⁻⁵. Muchas de estas vacunas (malaria, HIV SIDA, hepatitis B, tuberculosis) están en estado de ensayo clínico fase I/II en el humano y es de esperar que muy pronto se produzcan resultados.

Antecedentes históricos

Hace muchos años que se sabe que un tumor puede ser transferido de un animal a otro por la inyección del ADN tumoral. En 1960 Ito⁶ inyectó en conejos vírgenes un extracto fenólico del papiloma de Shope de conejo, y

Recibido: 9-V-2000

Aceptado: 4-VII-2000

Dirección postal: Dr. Moisés Spitz, Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas José de San Martín, Av. Córdoba 2351, 1120 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4508-3780

e-mail: inmuno@fmed.uba.ar

notó la aparición de papilomas en los animales inyectados. Dos años más tarde Atanasiu⁷ comunicó la producción de tumores y de anticuerpos anti-tumor en cobayos inyectados con ADN purificado de virus Polioma, asegurando que la transferencia no era debida a la presencia de virus en el inóculo.

En 1983 Nicolau⁸ inyectó liposomas conteniendo ADN de proinsulina y notó una marcada disminución en el nivel de glucosa circulante, sugiriendo un aumento de la insulina debido a la expresión del gen. En 1986 Benveniste y Reahef⁹ comunicaron la expresión del gen del cloranfenicol acetyl transferase (CAT), del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), de la hormona de crecimiento humana y de la insulina, por la inyección intraperitoneal de ADN precipitado con fosfato de calcio. Si bien todos estos y otros experimentos mostraban claramente el potencial de los plásmidos de ADN para la transferencia y expresión de genes, prevaleció la idea que el ADN libre sería rápidamente degradado en la circulación. Recién en 1990 Wolff y col.¹⁰ comunicaron la expresión, en el músculo esquelético de ratón, de CAT, luciferasa, y beta galactosidasa (β -gal) por largos períodos, como resultado de la inyección intramuscular de ADN "desnudo" conteniendo esos genes.

En un principio se pensó que las células del músculo eran las únicas que podían capturar el ADN de una solución salina y ser transfectadas¹⁰.

Más adelante se halló que la inmunización se podía hacer por diferentes vías y usando diferentes métodos. Se ensayaron todas las vías de inmunización y se encontró que las más efectivas eran la intramuscular (i.m)¹⁰, la intradérmica (i.d)¹¹, o a través de mucosas^{12, 13}.

En cuanto a los métodos de inoculación, los más populares son la pistola neumática (gene gun) y la aguja hipodérmica, siendo esta última la más usada^{6, 11}.

Cualquiera sea el procedimiento de introducción del plásmido, las células transfectadas se convierten en verdaderas fábricas del antígeno inmunizante.

La introducción del plásmido genera una respuesta que involucra tanto la rama celular como la humoral del sistema inmune. Se produce una activación de los linfocitos T citotóxicos, con restricción a MHC I y los linfocitos CD 4+ con restricción a MHC II^{7, 14, 15}.

El músculo esquelético

El miocito capta, incorpora y expresa los plásmidos inyectados por vía i.m.

Algunos investigadores demostraron que se puede aumentar la incorporación del plásmido en la célula muscular dañando el tejido muscular por medio de una inyección de bupivacaína¹⁶ o cardiotoxina^{17, 18}. Sin embargo no está claro si el aumento de la respuesta inmune es debido a una mayor expresión del antígeno en el

músculo que se está regenerando o a un mayor reclutamiento de células presentadoras del antígeno (CPA). El músculo estriado no puede ser considerado un tejido inmunológicamente importante puesto que casi no contiene células dendríticas, macrófagos o linfocitos; por otra parte los miocitos no pueden presentar antígeno pues carecen de los elementos esenciales de una CPA tales como MHC-II, moléculas coestimuladoras y linfoquinas.

En los experimentos realizados por Manickan y col.²⁹ se demostró que la inyección intramuscular de células dendríticas (CD) transfectadas *in vitro* con ADN codificando dos proteínas del virus *herpes simplex* indujeron una respuesta inmune y una considerable resistencia a un posterior desafío con virus vivo. En cambio los macrófagos igualmente transfectados *in vitro* no indujeron ninguna respuesta inmune *in vivo*, pese a que el plásmido se expresaba correctamente en ellos *in vitro*²⁹.

Estos resultados sugieren claramente la intervención de las CD en la respuesta a una inmunización i.m. Ahora bien, ya hemos visto que en el músculo casi no hay CD aunque algunas podrían ser reclutadas en respuesta a la inyección. Entonces ¿cuál es la célula que presenta el antígeno codificado por el gen del plásmido en una inmunización por vía i.m.? Todavía no podemos descartar la posibilidad que los miocitos de alguna manera, presenten el antígeno expresado. Las células citotóxicas (CTL) podrían recibir la primera señal del complejo péptido/MHC clase I expresado por el miocito y la segunda señal (coestimulación) de CPAs activadas por las células Th1 reclutadas por la inflamación debida a la inyección, aunque esta posibilidad entraría en contradicción con el dogma de la colaboración CD8+ y CD4+ que sostiene que para lograr una eficaz activación de las CTL (CD8+) éstas y las Th1 (CD4+) deben reconocer el antígeno y las señales coestimuladoras apropiadas sobre la misma célula CPA.

Los miocitos pueden ser blanco de ataque de células citotóxicas y pueden presentar antígenos a las células T en cultivos *in vitro*²⁰. Por otra parte los macrófagos y las CD podrían capturar el antígeno liberado por el miocito y presentarlo a las CTL.

En ese contexto Ulmer y col.²¹ lograron una buena respuesta humoral y celular en ratones inyectados con células de una línea de mioblastos transfectados *in vitro* con ADN que expresa la nucleoproteína (NP) del virus influenza, y demostraron que la expresión de la proteína viral por los miocitos transfectados es suficiente para inducir una buena y protectora respuesta celular. En este experimento la única fuente del inmunógeno fue, sin duda, el mioblasto transfectado. Sin embargo Torres y col.²² comunicaron experimentos cuyos resultados apuntan en sentido totalmente opuesto: la remoción del paquete muscular 10 minutos después de la inoculación no reduce la magnitud de la respuesta inmune²², la pre-

sencia de la fibra muscular no es indispensable para que se produzca la respuesta inmune.

Teniendo en cuenta que la inyección intramuscular requiere un volumen de líquido relativamente grande comparado con el paquete muscular, se puede pensar que parte del líquido rebalsa el músculo y difunde por vía linfática y sanguínea a los ganglios linfáticos. Efectivamente Winegar y col.²³ pudieron detectar el plásmido, pocas horas después de su inyección i.m., en el suero de los animales inyectados.

Otra serie de experimentos tendientes a determinar cuál es la célula que presenta el antígeno del plásmido después de una inyección i.m., utilizaron quimeras formadas por ratones híbridos irradiados y recuperados con médula ósea de uno de los progenitores^{24, 26}. En todos estos experimentos la presentación del antígeno estuvo restringida a las células de médula ósea.

Si la proteína es sintetizada por el miocito y presentada por una célula de médula ósea, de acuerdo al concepto clásico de presentación de antígenos, esa molécula debería ser presentada con MHC clase II y no con clase I, requisito indispensable para que haya una respuesta celular. No obstante, en esos experimentos, se obtuvo una buena repuesta celular (MHC clase I). Sin embargo la idea de que solamente los péptidos autólogos, generados en el citosoma, pueden ser presentados con MHC clase I, está hoy muy desacreditada pues hay abundantes evidencias de que péptidos de diferente procedencia, pinocitados o fagositados por las CPA pueden ser presentados con MHC clase I²⁷. Donnelly y col.²⁸ compararon las respuestas inmunes obtenidas inyectando el plásmido por vía intravenosa, intradérmica o intramuscular, y la mejor respuesta de protección contra el desafío con virus influenza vivo la obtuvieron en los animales inmunizados por vía i.m.

Es sabido que los macrófagos, las células dendríticas y las células B son capaces de procesar antígenos *in vitro*²⁹. Sin embargo no está definida la importancia relativa de cada uno de estos tipos celulares para la inducción de células citotóxicas, el procesamiento y la presentación del antígeno a las células T, *in vivo*.

Así se puede imaginar, como en el caso de la síntesis de anticuerpos, que para la generación de células citotóxicas hace falta la interacción de varios tipos celulares^{30, 31}. La importancia de los macrófagos en el procesamiento de antígenos particulados se destaca por su ubicación estratégica en la zona marginal de los ganglios donde, por vía de los capilares, se descargan los antígenos particulados³².

Por otra parte, está firmemente demostrado que las CD funcionan como CPAs, coestimuladoras y productoras de interleuquina 12 (IL 12) en la activación de los linfocitos T^{33, 35}. Al parecer habría suficiente evidencia experimental para asumir que el miocito tiene un rol importante en la respuesta inmune a una vacuna de ADN.

Esto puede ser así en la inyección i.m. pero ¿qué pasa con la inyección intradérmica o la vacunación con la pistola neumática?

La piel

La piel y las mucosas, están donde la mayoría de los antígenos y los patógenos van a hacer el primer contacto con el organismo animal. La piel y el tejido linfoide asociado contienen células que se especializan en iniciar y estimular la respuesta inmune. Los queratinocitos producen interleuquina 1 y factor necrosante de tumor α (TNF α 1) los que pueden activar linfocitos, macrófagos y CD^{36, 37}. Un grupo de linfocitos T circulantes (linfocitos epidermotrópicos) se alojan en la piel y juegan un rol importante en la inmunidad cutánea³⁸. Las células dendríticas presentan los péptidos expresados con marcada eficiencia.

Las CD de la piel pueden ser transfectadas directamente por la inyección intradérmica³⁹ o por la pistola neumática⁴⁰.

La pistola neumática es un método muy eficiente de poner el plásmido directamente dentro del citoplasma de la célula, así nanogramos de plásmido introducidos con la pistola dan una respuesta similar a la obtenida con microgramos inyectados con aguja y jeringa.

Se ha sugerido que diferentes formas de inmunización con ADN generan anticuerpos de diferentes isotipos: la inyección de ADN en solución fisiológica (i.m. o i.d.) generaría predominantemente anticuerpos de tipo IgG2a, en tanto que la inmunización con pistola neumática induciría la síntesis de anticuerpos IgG1. El empleo de diferentes dosis de inmunógeno no afecta este perfil.

Mor y col.⁴¹ demostraron que la respuesta inmune inicial, resultante de la inyección de una vacuna de ADN, tiene su origen en los ganglios linfáticos, en tanto que Condon y col.⁴⁰ demostraron que las CD transfectadas por el plásmido que cubre las partículas de oro, migran dentro de las 24 hs desde la piel hacia los ganglios linfáticos regionales. Sin embargo, la cinética de esta migración no fue estudiada ni tampoco su contribución relativa a una respuesta primaria o de memoria. Además, cuando la inmunización con la pistola neumática se hizo en la piel abdominal del ratón, las células que expresaron el gen transfectado fueron los queratinocitos⁴².

La migración de los linfocitos transfectados con la pistola hacia los ganglios regionales no está vinculada a la entrada o a la expresión del plásmido en la célula. El efecto mecánico de la entrada de los granos de oro, provoca la migración de las células dendríticas de la piel hacia los ganglios linfáticos regionales⁴⁰.

Los resultados publicados por Condon y col.⁴⁰ no excluyen la posibilidad de que las partículas de oro se des-

placen a través de los linfáticos hasta los ganglios donde serían capturadas por las CD residentes, aunque es sabido que la unión del plásmido a las partículas de oro es muy débil y se lava rápidamente en contacto con líquido.

Por otra parte no se ha podido resolver cuál es la participación de las células no migratorias de la epidermis en la inducción de la respuesta inmune.

Con la pistola neumática la principal célula transfectada sería el queratinocito⁴³, en tanto que por inmunización intramuscular con el uso de aguja, la principal célula transfectada es el miocito⁴⁴. La inmunización por la piel con la pistola neumática parece favorecer una respuesta a Th2⁴³ en tanto que la inyección intramuscular parecería favorecer la respuesta a Th1⁴⁵.

En experimentos realizados en nuestro laboratorio⁴⁶ hemos demostrado que por inyección intraesplénica del plásmido conteniendo el gen de la proteína p18 de *Brucella abortus* se pueden obtener hibridomas específicos contra esa proteína. Como en el bazo no hay miocitos ni queratinocitos, la célula directamente transfectada debe ser otra. ¿Cuáles son las evidencias experimentales que nos podrían ayudar a decidir cuál es el rol de las células fijas o migratorias en una inmunización con ADN por vía intradérmica usando la pistola neumática? Experimentos publicadas por Klinman y col.⁴⁷, en que a distintos tiempos se remueve el trozo de piel inoculado y se lo transplanta sobre animales vírgenes, señalan que:

- a) la inmediata remoción de la piel vacunada, suprime totalmente la respuesta inmune
- b) cuando el sitio transplantado se deja intacto, en su lugar, en 5 a 24 hs se obtienen respuestas primarias de células T y B
- c) si el sitio vacunado se transfiere dentro de las 5 hs a un animal virgen, se induce en éste una respuesta T primaria
- d) cuando más tiempo se deja el implante en su sitio, (hasta 2 semanas) mayor es la magnitud de la respuesta inmune.

Estos resultados sugieren que una parte importante del plásmido inoculado abandona el sitio de vacunación durante las primeras 5 horas. Además se pudo detectar la expresión de β galactosa en la unión de la dermis con la epidermis tan sólo 6 hs después de bombardear ésta con partículas de oro recubiertas con ADN con el gen reporter de la β galactosa, y esa expresión se mantuvo por 72 hs. La interpretación más lógica de estos resultados sería que células transfectadas son migratorias. Podría muy bien ser una célula de Langerhans o un linfocito circulante que después de transfectado migra rápidamente.

Se podría obtener una buena evidencia sobre la intervención de las células migratorias de la piel (Langerhans) si se pudieran aislar *in vitro* las células que

migran después de la inmunización, pero todos los experimentos tendientes al aislamiento de esas células han fracasado, aun cuando se ha reducido al mínimo el tamaño de los trozos de piel y se ha removido al máximo la grasa que la recubre. Sin embargo se pudieron obtener *in vitro* CDs que migró de la oreja inmunizada de ratón⁴⁸. Esas células inyectadas en ratones vírgenes indujeron una respuesta inmune humoral y celular. Esto estaría indicando que las CDs presentan el antígeno unido a MHC clase I y a clase II. La diferencia en la irrigación entre la piel y la oreja podría explicar la diferente migración de las CDs. Estos resultados no concuerdan con los comunicados por Johnston mencionados por Leitner y col.⁴⁹ quienes encontraron que la remoción de la oreja del ratón inmediatamente después de inmunizada con la pistola neumática no suprime la respuesta inmune normal del animal. Cabe señalar que los queratinocitos transfectados continúan produciendo antígeno durante dos semanas (aunque la producción mayor ocurre dentro de los tres días), en tanto que las CDs transfectadas migran durante las primeras 24 hs²².

Las mucosas

Las mucosas constituyen la parte más expuesta del organismo animal y la puerta de entrada de la mayoría de los patógenos. Sin embargo salvo para polio y BCG no se ha podido inducir una inmunidad protectora por esta vía.

La administración en mucosas, del ADN, ya sea en forma de gota¹³, en liposomas¹¹, o de microesferas⁵⁰ no fue tan exitosa como la inyección i.m., i.d. o con la pistola neumática, y no se sabe a ciencia cierta cuál es la célula que se transfecta y expresa el gen del plásmido.

Sin embargo, se ha visto que en lugar de inyectar el plásmido, para lo cual hay que expandirlo en *Escherichia coli* y purificarlo, se puede inmunizar directamente con la bacteria en la que se ampliará el plásmido con el gen reporter. Así Sizemore y col.⁵¹ usando una cepa atenuada de *Shigella* "cargada" con el plásmido conteniendo el gen de la β galactosidasa de *E. coli* pudieron inmunizar ratones por vía intranasal e inducir, en ellos, una respuesta proliferativa y de anticuerpos contra la β gal. Darji y col.⁵² desarrollaron en una mutante atenuada de *Salmonella typhimurium* plásmidos que expresaban antígenos de *Listeria*, administraron a ratones esa *Salmonella* por vía oral encontrando desarrollo de inmunidad protectora contra la infección con *Listeria*. La bacteria viva y atenuada transporta el plásmido a través del estómago y por las células M llega a las placas de Peyer, penetra en los macrófagos y las CD, donde, por la mutación que llevan, mueren liberando el plásmido.

En experimentos realizados con el propósito de estudiar la acción inmunoregulatoria de la IL-10, Chun y col.⁵³ encontraron que el plásmido administrado en forma de

gotitas en la nariz de ratones era rápidamente distribuido por todo el organismo del animal. La diseminación del plásmido parecería hacerse por vía sanguínea, pues cinco horas después de la administración se pudo encontrar el plásmido en la sangre circulante.

En tejidos distantes del sitio de aplicación, como el bazo, los ganglios linfáticos, el hígado, la médula ósea y la piel de la oreja se mostró la presencia de células transfectadas. En estos experimentos el miocito y el queratinocito quedan totalmente excluidos como protagonistas de la expresión del plásmido, pero aún resta saber cuál es la célula transfectada y cuál el mecanismo de transfección.

Conclusión

Los miocitos, los queratinocitos, las células dendríticas y los macrófagos, todos parecen participar de la respuesta inmune a una vacunación con ADN desnudo, ¿habrá alguno que participe más que los otros? El miocito aparece como la célula clave, sin embargo, cuando se extirpa el músculo, inmediatamente después de la inyección²², no se altera la respuesta inmune. Puede ser que el volumen de líquido usado en la inyección rebalse el músculo, pero ¿qué células se transfectan? Y ¿cuál es el mecanismo de transfección? La piel aparece como un tejido determinante pero, por una parte no está claro cuál es la célula que determina la respuesta, y por otra parte se hace difícil explicar el experimento (que se dio en llamar "de Van Gogh") en que la remoción de la oreja del ratón inmediatamente después de inmunizada con la pistola neumática, no modifica la respuesta inmune del animal⁴⁹.

Finalmente, en el bazo no hay miocitos ni queratinocitos, pero por inyección del plásmido, aparecen células que pueden dar origen a hibridomas específicos. Todavía no tenemos información sobre la respuesta en anticuerpos circulantes o células citotóxicas o la respuesta al desafío en una inmunización intraesplénica.

No cabe ninguna duda que las vacunas de ADN constituyen un avance fundamental para la prevención de enfermedad. Los adelantos, tanto en el terreno teórico como en el práctico son importantes. También son importantes las nuevas preguntas que se plantean. Resolver el mecanismo de transfección del ADN y la participación de cada tipo celular en una respuesta eficaz y duradera es de vital importancia para la construcción de mejores vacunas.

Las vacunas de ADN constituyen un avance fundamental para la prevención de enfermedades infecto-contagiosas.

Agradecimiento: Las investigaciones mencionadas fueron posibles gracias al subsidio PIP 0764 del CONICET y PICT 0084 de la AMPCYT.

Bibliografía

1. Manickan E, Rouse R, Yu ZY, Wire WS, Rouse BT. Genetic immunisation against herpes-simplex-virus protection is mediated by CD4+ T-lymphocytes. *J Immunol* 1995; 155: 259-65.
2. Donnelly JJ, Friedman A, Martinez D, et al. Preclinical efficacy of a prototype DNA vaccine: Enhanced protection against antigenic drift in influenza virus. *Nature Med* 1995; 1: 583-5.
3. Sedegah M, Hedstrom R, Hobart P, Hoffman SL. Protection against Malaria by immunization with plasmid DNA encoding circumsporozoite protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9866-70.
4. Tascon RE, Colstom MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory MD, Lowrie DB. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nature Med* 1996; 2: 888-92.
5. Xu D, Liew FY. Protection against leishmaniasis by injection of DNA encoding a major surface glycoprotein. Gp63 of L-major. *Immunology* 1995; 84: 173-6.
6. Ito YA. Tumour-producing factor extracted by phenol from papillomatous tissue (Shope) of cotton tail rabbits. *Virology* 1960; 12: 596-602.
7. Atanasiu P. Production de tumeur chez le hamster par inoculation d'acide desoxyribonucleique extrait de cultures des tissus infectés par le virus de polyome. *Acad Sci* 1962; 254: 4228-39.
8. Nicolau C, LePape A, Soriano P, Fargette F, Juhel MF. *In vivo* expression of rat insulin after intravenous administration of the liposomes-entrapped gene for rat insulin 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 1068-76.
9. Benvenisty N, Reshef L. Direct introduction of genes into rats and expression of the genes. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 83: 9551-9.
10. Wolff JA, Malone RW, Williams P, et al. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science* 1990; 247: 1465-8.
11. Raz E, Carson DA, Parker SE, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 9519-23.
12. Chen SC, Jones DH, Finan EF, et al. Protective immunity induced by oral immunization with rotavirus DNA vaccine encapsulated in microparticles. *J Virol* 1998; 72: 5757-61.
13. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, et al. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 11478-87.
14. Manickan E, Karen KL, Rouse BT. DNA vaccines modern gimmick or a boom to vaccinology? *Crit Rev Immunol* 1997; 17: 139-54.
15. Wang B, Godillot AP, Madaio MP, Weiner DB, Williams WV. Vaccination against pathogenic cells by DNA inoculation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1998; 226: 21-35.
16. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. Use of plasmid DNA for direct gene transfer and immunization. *Ann NY Acad Sci* 1995; 772: 21-9.
17. Davis HL, Whalen RG, Demeneix BA. Direct gene transfer into skeletal muscle *in vivo*: factors affecting efficiency of transfer and stability of expression. *Hum Gene Ther* 1993; 4: 151-9.
18. Le Borgne S, Mancini M, Le Grand R, et al. *In vivo* induction of specific cytotoxic T lymphocytes in mice and rhesus macaques immunized with DNA vector encoding an HIV epitope fused with hepatitis B surface antigen. *Virology* 1998; 240: 304-15.

19. Manickan E, Kanangat S, Rouse RJ, Yu Z, Rouse BT. Enhancement of the immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells. *J Leukocyte Biol* 1997; 61: 125-32.
20. Goebels N, Michaelis D, Wekerle H, Hohlfield R. Human myoblast as antigen presenting cells. *J Immunol* 1992; 149: 661-7.
21. Ulmer JB, Deck RR, DeWitt CM, et al. Expression of viral protein by muscle cells *in vivo* induces protective cell-mediated immunity. *Vaccine* 1997; 15: 839-41.
22. Torres CA, Iwasaki A, Barber BH, Robinson HL. Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunization. *J Immunol* 1997; 158: 4529-36.
23. Winegar RA, Monforte JA, Suing KD, O'Loughlin KG, Rudd GJ, McGregor JT. Determination of tissue distribution of an intramuscular plasmid vaccine using PCR and *in situ* hybridization. *Hum Gene Ther* 1996; 7: 2185-9.
24. Fu Tong-Ming, Ulmer JB, Caulfield MJ, et al. 1996 Priming of cytotoxic T lymphocytes by DNA vaccines: Requirement for professional antigen presenting cells and evidence for antigen transfer from myocytes. *Mol Med* 1997; 3: 362-71.
25. Corr M, Lee DJ, Carson Da, Tighe H. Gene vaccination with naked plasmid DNA: mechanism of CTL priming. *J Exp Med* 1996; 184: 1555-60.
26. Iwasaki A, Aurora C, Torres T, Ohashi SP, Robinson HL, Barber BH. The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J Immunol* 1997; 159: 11-4.
27. Bevan MJ. Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes *in vivo*. *J Exp Med* 1995; 182: 639-47.
28. Donnelly Donnelly JJ, Ulmer JB, Liu MA. Protective efficacy of intramuscular immunization with naked DNA. *Ann NY Acad Sci* 1995; 772: 4047-54.
29. Weaver CT, Unanue ER. The costimulatory function of antigen presenting cell. *Immunol Today* 1990; 11: 39-46.
30. Knight SC, Stagg AJ. Antigen presenting cell types. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 374-9.
31. Van Rooijen N. Macrophages as accessory cells in the *in vivo* humoral immune response: from processing of particulate antigens to regulation by suppression. *Semin Immunol* 1992; 4: 237-46.
32. Szakal AK, Kosco MH, Tew JG. Microanatomy of lymphoid tissue during humoral immune response: structure function relationships. *Ann Rev Immunol* 1989; 7: 91-112.
33. Celia M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann, Iane P, Lanzavecchia A, Alber G. Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* 1996; 184: 747-52.
34. Cella M, Sallustro F, Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 1997; 9: 10-6.
35. Heufler C, Koch F, Stanzl U, et al. Interleukin 12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; 26: 659-68.
36. Bos JD, Kapsenberg ML. The skin immune system: Progress in cutaneous biology. *Immunology Today* 1993; 14: 75-8.
37. Streilein JW. Tissue barriers, immunosuppressive microenvironments, and privileged sites: the eye's point of view. *Regl Immunol* 1993; 5: 253-68.
38. Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 271-96.
39. Raz E, Carson DA, Parker SE, et al. Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. *Proc Nat Acad Sci USA* 1994; 91: 9519-24.
40. Condon C, Watkins SC, Celluzi CM, Thompson K, Faló LD. DNA based immunization by *in vivo* transfection of dendritic cells. *Nature Med* 1996; 2: 1122-8.
41. Mor G, Klinman DM, Shapiro S, et al. Complexity of the cytokine and antibody response elicited by immunizing mice with *Plasmodium yoeli* circumsporozoite protein plasmid DNA. *J Immunol* 1995; 155: 2039-47.
42. Lu B, Scott G, Goldsmith LA. A model for keratinocyte gene therapy: Preclinical and therapeutic considerations. *Proc Assos Am Physicians* 1996; 108: 165-72.
43. Felquate DM, Geaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol* 1997; 158: 2278-84.
44. Raz E, Tighe H, Sato Y, et al. Preferential induction of a Th1 immune response and inhibition of IgE antibody formation by DNA immunization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93: 5141-52.
45. Waime GJ, McManus DP. Nucleic acids: Vaccines of the future. *Parasitol Today* 1995; 11: 113-6.
46. Velikovskiy CA, Cassataro J, Sanchez M, Fossati CA, Fainboim L, Spitz M. Single-shot DNA intrasplenic immunization for the production of monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 2000 (in press).
47. Klinman DM, Sechler JMC, Conover J, Gu M, Rosenberg AS. Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J Immunol* 1998; 160: 2388-92.
48. Boulloc A, Walker P, Grivel JC, Vogel JC, Katz SI. Immunization through dermal delivery of protein-encoding DNA: a role for migratory dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 446-54.
49. Leitner WW, Ying H, Restifo NP. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects. *Vaccine* 2000; 18: 765-77.
50. Jones DH, Corris S, McDonald S, Clegg JCS, Farrar GH. Poly (DL-lactide-co-glycolide) encapsulated plasmid DNA elicits systemic and mucosal antibody responses to encoded protein after oral administration. *Vaccine* 1997; 15: 814-7.
51. Sizemore DR, Branstromand AA, Sadoff JC. Attenuated bacteria as a DNA delivery vehicle for DNA-mediated immunization. *Vaccine* 1997; 15: 804-9.
52. Darji A, Guzman A, Getstel B, et al. Oral somatic transgene vaccination using attenuates *S typhimurium*. *Cell* 1997; 91: 617-24.
53. Chun S, Daheshia M, Lee S, Eo SK, Rouse BT. Distribution, fate and mechanism of immune modulation following mucosal delivery of plasmid DNA encoding IL-10. *J Immunol* 1999; 163: 2393-402.