

Producción de Vacunas de 2º Generación a partir de Proteínas Recombinantes

Sguazza, Guillermo Hernán

Cátedra De Virología - Facultad De Ciencias Veterinarias.

Universidad Nacional de La Plata.

sguazza@fcv.unlp.edu.ar

Director: Pecoraro, Marcelo Ricardo. Ph. D.

Resumen

El objetivo de este trabajo, consiste en clonar y expresar un fragmento del gen que codifica para una de las proteínas más antigénicamente reactivas de la superficie del virus de la influenza equina: la hemoaglutinina; utilizando uno de los métodos de obtención de proteínas en células eucariotas más ampliamente difundido, el sistema Baculovirus-Células de insecto. Con el fin de conseguir esto, un segmento de este gen fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el producto así obtenido fue consecutivamente manipulado por medio de técnicas de biología molecular e ingeniería genética hasta conseguir clonarlo dentro de un vector de expresión baculoviral con el propósito de obtener una proteína recombinante en cultivos de células de insecto.

Una vez purificada la proteína recombinante se planea evaluar *in vivo* la capacidad inmunogénica y protectora de este producto y en base a ello establecer una forma de vacunación efectiva que permita su utilización en el desarrollo de nuevas vacunas contra la influenza equina.

Palabras claves: Influenza equina – Hemoaglutinina – Baculovirus.

Introducción

La influenza equina es una enfermedad clínica que afecta a caballos, asnos y mulas y hoy en día es la mayor causa de enfermedades respiratorias en équidos en todo el mundo [1], su agente causal es un virus perteneciente a la familia *orthomyxoviridae*. Estos virus están constituidos por un genoma formado por ocho segmentos de ARN de simple cadena y polaridad negativa; cada uno de estos segmentos, se encuentra unido a nucleoproteínas (NP), dentro de la nucleocápside también se localizan las tres polimerasas virales (PB1, PB2, PA) y dos proteínas no estructurales (NS1 y NS2) que actúan como reguladoras de la transcripción, a su vez, la nucleocápside se encuentra recubierta por una envoltura lipídica que está tapizada por las proteínas de matriz y membrana (M1 y M2). La superficie externa de estos virus, está cubierta por dos glicoproteínas con forma de espículas, la hemoaglutinina (HA) y la neuranimidasa (NA) [2].

La partícula viral posee tres componentes antigénicos, uno de ellos es la nucleoproteína, cuyas diferencias antigénicas permiten clasificarlos en tres grandes tipos (A, B y C). Los virus del tipo A son los únicos que a su vez se pueden subdividir en diferentes subtipos de acuerdo a la composición de las otras dos proteínas antigénicas: la HA y la NA. Los virus del tipo B y C son patógenos predominantemente humanos aunque también han sido aislados a partir de mamíferos marinos y cerdos respectivamente y solamente producen infecciones respiratorias muy leves. Por otro lado los virus del tipo A presentan un rango de huésped más amplio y han sido aislados a partir de muchas especies incluyendo humanos, cerdos, caballos, mamíferos marinos y un vasto número de aves domésticas y salvajes [3] que forman el reservorio natural del virus, y si bien los virus aviares generalmente no son patogénicos para sus hospedadores naturales pueden causar una morbilidad y mortalidad significativa al ser transmitidos a otras especies [4].

De todos los subtipos posibles, sólo se han identificado dos que son capaces de infectar equinos. El subtipo 1 (H7N7) aislado inicialmente en Praga en 1956 y posteriormente en muchos países del mundo, pero que no se ha vuelto a aislar desde la década del 80 y en la actualidad sólo presenta casos subclínicos [5] y el subtipo 2 (H3N8) de origen americano que fue aislado por primera vez en

el año 1963, durante una gran epizootia de esta enfermedad ocurrida en Miami. Luego la infección se diseminó por toda Europa y a partir de entonces la población equina de todas partes del mundo ha sufrido varias epizootias de influenza. En nuestro país hubo una gran epizootia en el año 1985 provocada por el subtipo 2 y actualmente existe una ley que establece la vacunación obligatoria de caballos de competición, que posiblemente ha contribuido en la prevención de nuevas epizootias.

La vacunación contra la influenza equina se ha practicado desde la década del 60, pero aunque las vacunas se han mejorado considerablemente desde entonces, aun existen fallas en la eficacia en condiciones de campo [6]. Las vacunas actualmente disponibles inducen una respuesta inmune con una vida media muy baja [7], cuantitativamente menor a la inmunidad obtenida luego de la infección natural con el virus [8, 9] y frecuentemente no protectora [10, 11].

La principal responsable de la respuesta inmune hacia el virus es la hemoaglutinina. Esta proteína codificada por el segmento 4 del genoma viral, inicialmente se traduce como una pre-proteína (HA0) que luego se escinde en dos subunidades (HA1 y HA2). Posteriormente, ambas subunidades se unen por un puente disulfuro y se ensamblan formando una estructura trimérica (HA1-HA2)₃. En la conformación espacial que toma la hemoaglutinina madura, solamente la subunidad HA1 queda expuesta y es por lo tanto donde se encuentran la mayor parte de los representantes antigénicos.

Como punto de partida para la elaboración de vacunas contra esta enfermedad, se requiere un alto título viral, la técnica más empleada para conseguir esto es la propagación del virus en la cavidad alantoidea de huevos embrionados, lo que lo convierte en un método muy laborioso, de larga duración, elevado costo y baja eficiencia. También se requieren sucesivos pasos de concentración, purificación y posterior inactivación del virus con agentes químicos, que acarrear mayores gastos de tiempo y dinero, así como un alto riesgo biológico debido a la necesidad de mantener un stock permanente de partículas infectivas por medio de sucesivos pasajes [12].

Por lo tanto, una manera de evitar los inconvenientes inherentes a la producción de vacunas por el método convencional estaría dada por la posibilidad de obtener las proteínas del virus utilizando un sistema de expresión heterólogo, y ya que la protección por medio de la vacunación se fundamenta en la respuesta del sistema inmune contra la HA (y en particular contra la subunidad HA1), es posible la elaboración de una vacuna a partir de un polipéptido obtenido de forma recombinante, que facilitaría la obtención de grandes cantidades de antígeno, eliminando las desventajas del método actual y disminuyendo en forma considerable los gastos de producción.

Materiales y Métodos

Estudio de secuencias y Diseño de Primers

Para el diseño de los primers se realizó un alineamiento múltiple de secuencias del segmento 4 del subtipo H3N8. Se analizó un total de 48 secuencias (27 cepas americanas, 16 europeas y 5 de origen asiático) todas ellas obtenidas de la base de datos del GenBank. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Teniendo en cuenta las posibles enzimas a utilizar para el clonado y las regiones consenso de las secuencias alineadas, se diseñó el siguiente par de primers:

HA1F: 5' TACCATGGTCTACAGTCAAAACCCAACCAG 3'

HA1R: 5' CACTCGAGTTGCTTTTCTGGTACATTCCTC 3'

En los extremos de ambos primers se añadió un sitio de reconocimiento para enzimas de restricción (subrayados en la secuencia). Un sitio NcoI al primer HA1F y un sitio XhoI al primer HA1R.

Amplificación del segmento HA1 por RT-PCR

El ARN viral, fue extraído a partir 500µl de líquido alantoideo de huevos embrionados previamente inoculados con una cepa del virus de la influenza equina aislada anteriormente en nuestro laboratorio, utilizando el reactivo TRIZOL (GibcoBRL) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. 5µl (~250ng) del ARN extraído, fueron utilizados para obtener una copia de ADN complementario (cDNA) utilizando la enzima MMLV y el primer HA1R como cebador.

Para la reacción de PCR se utilizaron 5µl del cDNA, que fueron adicionados a una mezcla de reacción con la siguiente composición: 200µM de cada uno de los dNTPs, 1.5mM de MgCl₂, 0.2µM de cada primer (HA1F y HA1R), 2.5U de Taq DNApol y 1X del buffer provisto con la enzima, en un volumen final de 25 µl. La mezcla resultante fue sometida a una desnaturalización inicial a 94°C durante 1.5 minutos, seguida por 30 ciclos de amplificación (94°C 30seg, 63°C 30seg, 72°C 1min) y una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

Construcción del vector de clonado

El producto de PCR fue directamente ligado en el vector pCRTOP02.1, utilizando el kit comercial PCR-TOPO TA Cloning (Invitrogen) y subsiguientemente utilizado para transformar bacterias competentes (*Escherichia coli* TOP-10) de acuerdo al protocolo provisto por el fabricante.

El ADN plasmídico, de 12 colonias tomadas al azar, con el fenotipo deseado (colonias blancas y resistentes a ampicilina) fue extraído por *miniprep* (método de Birnboim & Doly) y analizado por digestión enzimática con XhoI, para verificar la presencia y la orientación del inserto.

Uno de los plásmidos previamente chequeados por digestión, fue purificado y enviado a secuenciar al instituto BRC (Biotechnology Resource Center) - Universidad Cornell (Ithaca -New York) para confirmar la correcta continuidad del marco de lectura del fragmento amplificado.

Construcción del vector para la expresión en células de insecto

El fragmento HA1 fue doblemente digerido con NcoI y BamHI y subclonado dentro del vector pFastBac-HTb (Invitrogen), el plásmido recombinante así obtenido (pFastBac-HA) se utilizó para transformar bacterias químicamente competentes (*E. coli* JM109).

El ADN plasmídico de las colonias obtenidas fue analizado por digestión enzimática con BglII y PCR (empleando el mismo protocolo utilizado inicialmente para amplificar el inserto).

Uno de los plásmidos (tomado al azar) obtenido y analizado como se explicó anteriormente fue utilizado para transformar bacterias químicamente competentes (*E. coli* DH10Bac) que luego fueron plaqueadas en agar Luria con 40µg/ml de IPTG, 200µg/ml de Bluo-Gal, 50µg/ml de Kanamicina, 7µg/ml de Gentamicina, 10µg/ml de Tetraciclina.

Las colonias en las que ha ocurrido la transposición (blancas) fueron analizadas por Colony-PCR con los primers M13F: 5'GTTTTCCCAGTCACGAC3' y M13R: 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'.

El ADN bacmídico, de una de las colonias positivas analizadas fue empleado para la transfección de células de insecto (*Spodoptera frugiperda* línea SF-21) por medio del reactivo Cellfectin (GIBCO BRL), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Con el objetivo de aumentar el título viral, a las 96 horas post-transfección se realizó un pasaje de 500µl del sobrenadante a un frasco de cultivo con células SF-21 (con un 80% de confluencia) en 4,5ml de medio TC-100 con un 10% de suero fetal bovino. A las 96 horas post-infección se realizó un segundo pasaje de igual manera que el anterior. El sobrenadante del último pasaje fue guardado a -70°C para ser utilizado posteriormente como stock viral en ensayos de expresión de la proteína.

Expresión y purificación de la proteína recombinante.

Con el fin de encontrar las condiciones óptimas para la expresión de la proteína se probaron distintas líneas celulares (SF-9, SF-21 y Hi-5) y medios de cultivo (TC-100, Grace y SF-900 II). Para cada uno de los cultivos ensayados, se tomaron alícuotas a diferentes tiempos post-infección que fueron analizadas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) con el fin de estimar los niveles de expresión. En cada uno de los casos se utilizaron como control negativo células sin infectar. Luego de hallar las condiciones óptimas se realizó un nuevo cultivo a mayor escala (30ml). Una vez alcanzado el tiempo de cosecha, las células fueron despegadas del frasco, lavadas 3 veces con PBS, luego se realizó la ruptura celular y las proteínas citoplasmáticas fueron purificadas por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC) empleando una columna con una matriz de ácido nitriloacético y níquel (Quiagen) de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Análisis *in vivo* de la respuesta inmune (En realización)

La proteína previamente purificada fue precipitada con etanol y centrifugada a 14.000rpm por 10min., luego de descartar el sobrenadante se dejó evaporar el resto del alcohol, se resuspendió el precipitado en 1ml de PBS y se esterilizó por filtración (con filtro de 0.22 μ m).

Con el objeto de determinar la capacidad de la proteína recombinante para generar anticuerpos neutralizantes, se inocularon 12 ratones Balb-c (tres grupos de cuatro) con la proteína previamente purificada por vía intranasal e intramuscular (con y sin adyuvante de Freund). Se planea realizar dos boosters a los 21 y a los 42 días post-inoculación y luego utilizar el suero de los ratones para probar la capacidad neutralizante de los anticuerpos obtenidos por ensayos de virus neutralización o inhibición de la hemoaglutinación (HI)

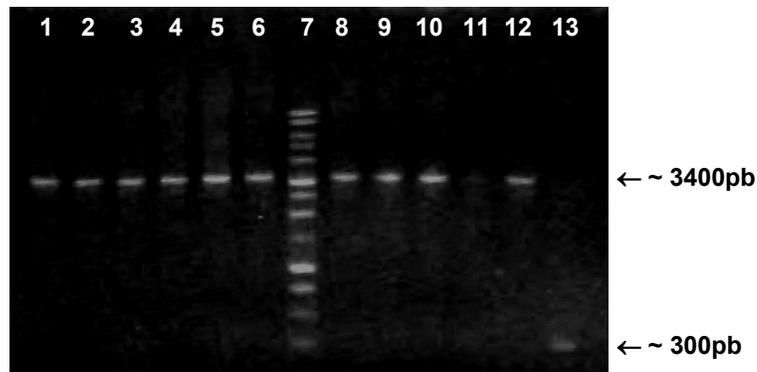
Resultados

Después de la RT-PCR pudo observarse en un gel de agarosa la presencia de una única banda de aproximadamente 1Kb, que se condice con el tamaño esperado para el producto de PCR (1002nt).

El clonado dentro del vector pCRTOP02.1, permitió secuenciar el fragmento HA1 amplificado por PCR y en base a los datos obtenidos poder realizar un alineamiento local contra la base de datos del Blast, obteniéndose como resultado un 99% de homología entre la secuencia de la cepa utilizada y una cepa previamente aislada en nuestro país (Influenza A/equine2/Argentina/99).

Luego del subclonado en vector pFastBac, se obtuvieron unas 50 colonias de las cuales 10 fueron analizadas por PCR y digestión con BglII. Todas las colonias examinadas resultaron positivas.

Como se observa en la siguiente figura, en el análisis de la transposición, todas las colonias blancas menos una (Calle:11) dieron positivas por PCR. Mientras que una colonia azul (Calle:13) utilizada como control negativo dio una banda de 300bp aproximadamente de acuerdo a lo esperado.



A partir de las 72 horas post-transfección comenzó a observarse efecto citopático (disminución de la tasa de crecimiento y muerte celular) debido a la formación de partículas virales. Así mismo, como era de esperar el efecto citopatogénico sobre las células se incremento con los sucesivos pasajes. Al realizar el segundo pasaje se observo muerte celular luego de las primeras 48 horas post-infección.

Las condiciones óptimas para la expresión de la proteína recombinante, se lograron en cultivos celulares de la línea Hi-5 (*Trichoplusia ni*) con el medio TC-100 suplementado con un 10% de suero fetal bovino, luego de las 72 horas post-infección.

Conclusiones

Hasta el momento, se ha logrado amplificar por RT-PCR y clonar con éxito una porción del gen que codifica para la hemoaglutinina del virus de la influenza equina, consiguiendo de esta manera la expresión de la subunidad HA1 en el sistema baculovirus/Células de insecto.

La mayor ventaja de este sistemas es que tiene la capacidad de expresar proteínas foráneas a muy altos niveles y en la actualidad se han logrado adaptar líneas celulares de insectos a las exigencias habituales de la producción a gran escala, lo que lo convierte en un sistema ideal para la producción de proteínas que puedan ser empleadas para la fabricación de nuevas vacunas, lo que constituye un paso crítico en el control de un patógeno tan importante como es el virus de la influenza.

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores, hasta no tener resultados sobre la capacidad de la proteína lograda para producir anticuerpos que sean capaces de neutralizar al virus, no se puede establecer fehacientemente la utilidad de esta proteína como un método alternativo para la elaboración de vacunas contra la influenza equina.

Bibliografía

- [1] Daly JM, Lai AC, Binns MM, Chambers TM, Barrandeguy M, Mumford JA. **Antigenic and genetic evolution of equine H3N8 influenza A viruses.** J Gen Virol. 1996;77 (Pt 4):661-71.
- [2] Timoney PJ. **Equine Influenza** Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 1996;19(3):205-11.
- [3] Webster RG, Bean WJ, Gorman OT, Chambers TM, Kawaoka Y. **Evolution and ecology of influenza A viruses.** Microbiol Rev. 1992;56(1):152-79.
- [4] Fouchier RA, Osterhaus AD, Brown IH. **Animal influenza virus surveillance.** Vaccine. 2003 1;21(16):1754-7.
- [5] Webster RG. **Are equine 1 influenza viruses still present in horses?.** Equine Vet J. 1993;25(6):537-8.
- [6] Park AW, Wood JL, Newton JR, Daly J, Mumford JA, Grenfell BT. **Optimising vaccination strategies in equine influenza.** Vaccine. 2003 20;21(21-22):2862-70.
- [7] Yates P, Mumford JA. **Equine influenza vaccine efficacy: the significance of antigenic variation.** Vet Microbiol. 2000 22;74(1-2):173-7.
- [8] Hannant D, Mumford JA, Jessett DM. **Duration of circulating antibody and immunity following infection with equine influenza virus.** Vet Rec. 1988 6;122(6):125-8.
- [9] Nelson KM, Schram BR, McGregor MW, Sheoran AS, Olsen CW, Lunn DP. **Local and systemic isotype-specific antibody responses to equine influenza virus infection versus conventional vaccination.** Vaccine. 1998;16(13):1306-13.
- [10] Morley PS, Townsend HG, Bogdan JR, Haines DM. **Efficacy of a commercial vaccine for preventing disease caused by influenza virus infection in horses.** J. Am. Vet. Med. Assoc. (1999) 215, 61–66.
- [11] Newton JR, Townsend HG, Wood JL, Sinclair R, Hannant D, Mumford JA. **Immunity to equine influenza: relationship of vaccine-induced antibody in young Thoroughbred racehorses to protection against field infection with influenza A/equine-2 viruses (H3N8).** Equine Vet J. 2000; 32(1):65-74.
- [12] Webster GR. **Influenza virus: transmission between species and relevance to emergence of the next human pandemic.** Arch Virol Suppl. 1997;13:105-13.