

Inducción de células T citotóxicas por Virus de Viruela Aviar recombinantes para proteínas poliepitópicas del Virus de la Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1)

Dania Vázquez Blomquist, Enrique Iglesias Pérez, Aina Méndez, Diógenes Quintana, Laritza Gorovaya, Eddy Ernesto González, Carlos A Duarte

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave 31 e/ 158 y 190, Playa.
Ciudad de La Habana. AP 6162, CP 10600, Cuba.
Telf.: (53-7) 271 6022; Fax: (53-7) 271 4764; E-mail: dania.vazquez@cigb.edu.cu

Resumen

En los últimos años, se ha reforzado la importancia de la respuesta inmune celular CD8⁺ en la protección contra el VIH-1. Una de las tecnologías que ha ofrecido mejores resultados en la inducción de respuesta de células T citotóxicas (CTL) es el empleo de los vectores vivos como vacunas. El Virus de la Viruela Aviar (VVA) es un vector cuyo uso en humanos no presenta riesgos porque su replicación es totalmente citoplasmática y abortiva en células de mamíferos. En este trabajo se presenta la generación, por primera vez en Cuba, de VVA recombinantes (VVA_r) para proteínas poliepitópicas de VIH-1 y la evaluación de la respuesta inmune inducida con dichos VVA_r en ratones. Como dianas se escogieron las proteínas TAB9 y CR3. TAB9 fue seleccionado como modelo porque contiene un epitopo inmunodominante para CTL en el ratón BALB/c. Por otra parte, CR3 se diseñó para su uso en ensayos clínicos en humanos y contiene regiones ricas en epitopos CTL sobrelapados provenientes de varias proteínas del VIH-1. Con estos inmunógenos se evidenció la generación de una respuesta inmune protectora en ratones BALB/c, caracterizada por la presencia de CTL contra diferentes epitopos del VIH-1 y un patrón de citocinas Th1. Finalmente se reporta también por primera vez que una dosis inicial con un Virus Vaccinia Ankara Modificado (MVA) seguida de una dosis de recuerdo con VVA_r, induce una respuesta CTL más potente que cada uno por separado o la combinación inversa. Los resultados resumidos en este trabajo permitieron proponer la evaluación de la inmunización con FPCR3 como proceder terapéutico en pacientes de VIH/SIDA.

Introducción

Actualmente existen 40 millones de personas viviendo con el VIH. En particular, las cifras son alarmantes en el África sub-Sahariana con 28.1 millones de casos, Sur y Sureste de Asia con 6.2 millones y América Latina con 1.4 millones. Debido al grave carácter de la situación socioeconómica de las principales regiones afectadas la OMS considera que las medidas educativas no son suficientes para erradicar la enfermedad, y que por lo tanto la aplicación de una vacuna puede complementar la estrategia de prevención y salvar la vida a millones de personas. La búsqueda de una vacuna eficaz contra el SIDA es técnicamente muy compleja. El VIH exhibe una considerable variación antigénica, no existe la experiencia de vacunas previas contra retrovirus, y no se ha logrado demostrar cuál de los componentes del sistema inmune (humoral ó celular) puede conferir protección. Por otra parte, la falta de un modelo animal satisfactorio complica la evaluación de los candidatos vacunales.

La primera generación de candidatos vacunales basados en subunidades recombinantes de la envoltura viral perseguía la inducción de una respuesta de anticuerpos neutralizantes contra el VIH-1. Sin embargo, los ensayos de fase 1 y 2 en humanos mostraron que la respuesta inducida estaba dirigida fundamentalmente contra la cepa vacunal u otras semejantes, pero no contra cepas más divergentes y la respuesta contra aislamientos primarios de pacientes era casi nula. La respuesta inmune inducida por estos candidatos fue preferentemente de tipo Th2, con una respuesta CTL marginal o inexistente.

En los últimos años, se ha reforzado la importancia de la respuesta inmune celular CD8⁺ en la pro-

tección contra el VIH-1. Los elementos principales se han derivado del estudio de la infección natural por el VIH-1, de personas altamente expuestas que permanecen seronegativas y de experimentos de reto en macacos.

Entre las diferentes tecnologías que se han venido desarrollando para obtener vacunas capaces de estimular la rama celular de la respuesta inmune, los mejores resultados experimentales se han obtenido con los vectores vivos. En particular los poxvirus han sido los vectores más empleados. El Virus de la Viruela Aviar (VVA) es un poxvirus aviar cuyo uso en humanos no presenta riesgos porque su replicación es totalmente citoplasmática y abortiva en células de mamíferos

En este trabajo se presenta la generación, por primera vez en Cuba, de VVA recombinantes (VVA_r) para proteínas poliepitópicas de VIH-1 y la evaluación de la respuesta inmune inducida con dichos VVA_r en ratones

Resultados y Discusión

Obtención de VVA_r

El primer objetivo trazado fue la asimilación de la tecnología de generación de VVA_r y la obtención de VVA_r para las proteínas poliepitópicas de VIH-1 TAB9 y CR3. TAB9 se seleccionó como modelo para establecer la tecnología, porque contiene el epitopo V3 de la cepa IIIB, el cual es inmunodominante para CTLs en el ratón BALB/c. Por otra parte, CR3 se diseñó para su uso en ensayos clínicos en humanos y contiene regiones ricas en epitopos CTLs sobrelapados provenientes de tres proteínas del VIH-1. En estas

regiones coexisten numerosos epitopos presentados por al menos 55 moléculas de HLA diferentes. El gen CR3 se ensambló en nuestro laboratorio a partir de fragmentos de ADN sintéticos o amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) a partir del genoma viral (Iglesias y cols, 2001).

Se generaron plasmidios que contienen las secuencias nucleotídicas codificantes para las proteínas TAB9 y CR3 bajo los promotores poxvirales p7.5K (pEFL-tab9 y pEFL-cr3) o sintético pE/L (pFP67xgpt-tab9 y pFP67xgpt-cr3), flanqueadas por secuencias para la recombinación homóloga con el VVA parental de la cepa FP9.

Con estos plasmidios se obtuvieron los respectivos VVA: FPTAB9LZ y FPCR3 para el promotor p7.5K y FPSTAB9gpt y FPSCR3gpt para el sintético pE/L, por recombinación homóloga a partir de la cepa parental de VVA FP9. (Vázquez y cols, 2002, Vázquez y cols, enviado a Vaccine)

La presencia de los genes heterólogos en los VVA producidos se verificó por RCP y la expresión *in vitro* de las proteínas heterólogas, a partir de cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo infectados con los VVA se comprobó por Western blot (Figura 1).

Evaluación de la respuesta inmune en ratones inmunizados con VVA para TAB9

Se inmunizaron ratones BALB/c con el virus FPTAB9LZ y la respuesta CTL se evaluó mediante ensayos de liberación de Cr⁵¹ y por ELISPOT de IFN- γ . En ambos casos se detectó una potente respuesta CTL contra TAB9, gp120 y una mezcla de 6 péptidos sintéticos de las regiones V3 presentes en TAB9. El péptido correspondiente al aislamiento IIIIB resultó ser ampliamente inmunodominante para BALB/c. No se detectó respuesta de anticuerpos por ELISA contra TAB9.

Se comprobó además que los linfocitos de los ratones inmunizados con FPTAB9LZ secretan preferentemente IFN- γ y no IL-4 al ser estimulados con el péptido IIIIB lo cual concuerda con la existencia de un patrón Th1, que era uno de los propósitos de este trabajo.

En otra serie de experimentos se estudiaron diferentes vías de administración del antígeno: intraperitoneal, intravenosa, intramuscular y subcutánea y las dos primeras resultaron las más eficientes en este modelo por lo que se emplearon en los siguientes experimentos (Vázquez y cols, 2002).

Ensayo de protección en ratones frente a reto con VV

Para evaluar la funcionalidad de la respuesta celular detectada *ex vivo* en los ratones inmunizados con FPTAB9LZ se estableció un modelo de reto con un virus Vaccinia (VV) recombinante. En este modelo, descrito previamente por otros autores, la protección ha sido directamente correlacionada con la respuesta CTL contra el antígeno heterólogo. En nuestro caso se empleó para el reto el VV que expresa el gen TAB13 (VVTAB13). Este gen contiene todos los epitopos presentes en TAB9. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la Figura 2. Los ratones inmunizados con FPTAB9LZ mostraron una reducción del título viral entre 2.7 y 4.7 logs con respecto a los

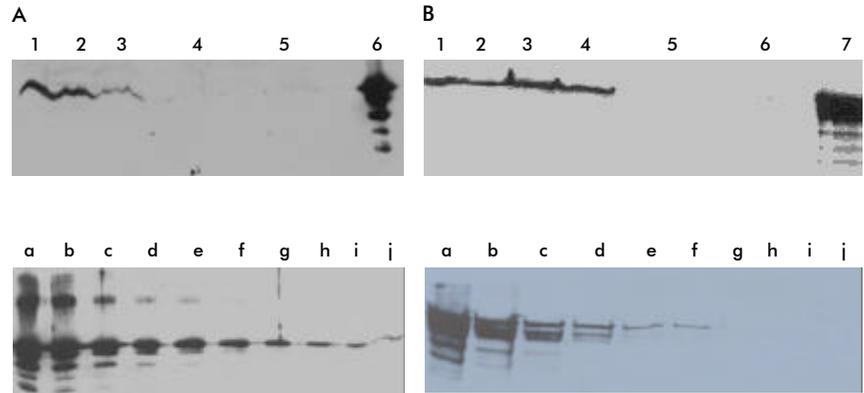


Figura 1. Western blot a partir de proteínas totales de FEP infectados con VVA. El panel A representa a TAB9 y el B a CR3. A1, A2: FPSTAB9gpt; A3: FPTAB9LZ; A4, A5: FPL29 como virus negativos; B1, B2: FPCR3; B3, B4: FPSCR3gpt; B5, B6: FPL29 como virus negativo. A6 y B7 representan 125 ng de TAB9 y CR3, respectivamente, purificada de *E. coli*. Para las muestras de TAB9 se aplicaron 300 mg totales, mientras que para CR3, 75 mg (B1, B3) y 37.5 mg (B2, B4). Las figuras de abajo representan curvas patrones de TAB9 (A) y CR3 (B) purificadas de *E. coli*, desde 125 ng (Aa, Ba) a 0.488 ng (Aj, Bj). Las proteínas se señalan con una flecha en los paneles superiores.

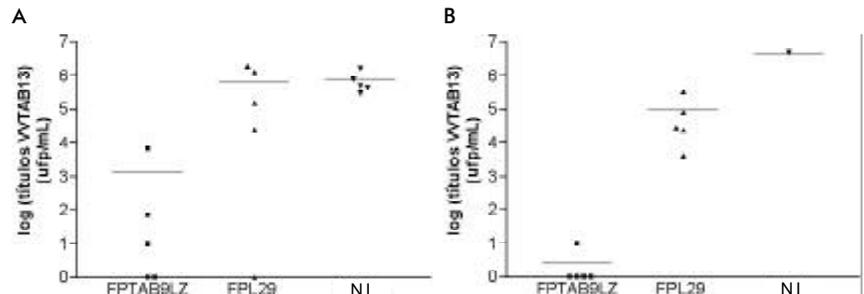


Figura 2. Titulación de VVTAB13 en los ovarios de los ratones. Ratones BALB/c recibieron dos dosis i.p separadas 15 días de 2.5×10^7 ufp en 200 mL de FPTAB9LZ o FPL29, o no se inmunizaron (NI). 15 días después se les reto por vía i.p con 10^7 (A) ó 5×10^7 (B) ufp de VVTAB13 y a los 5 días los ovarios se extrajeron y la suspensión viral se tituló en la línea celular BSC40. La gráfica representa el logaritmo (log) de los títulos virales en ufp/mL de cinco ratones por grupo y las líneas horizontales la media de cada grupo.

controles en dependencia de la dosis de VVTAB13 usada en el reto (Vázquez y cols, 2002). Este es el primer reporte en que se describen estos niveles de eficacia empleando solamente un poxvirus recombinante como inmunógeno ya que niveles comparables solo habían sido reportados para la combinación de ADN y VVA.

Procesamiento de epitopos CTLs y presentación a linfocitos de pacientes VIH+

El virus que expresa la proteína CR3 (VVCR3), se empleó para infectar células de sangre periférica de pacientes VIH+ y se demostró que estas estimulaban de forma específica la secreción de IFN gamma por parte de las células T de estos pacientes en un ensayo de ELISPOT. Este resultado nos permitió concluir que CR3 es correctamente procesada y al menos parte de sus epitopos CTL presentados en el contexto de HLA-1 y reconocidos por los linfocitos T CD8⁺ de pacientes infectados (Vázquez y cols, presentado a Vaccine).

Evaluación de la respuesta inmune en ratones inmunizados con VVA para CR3

Ratones BALB/c inmunizados por vía intraperitoneal con el virus FPCR3 indujeron respuesta de cé-

lulas T CD8⁺ detectable por ELISPOT de IFN- γ contra células blancas infectadas con VV recombinantes para *cr3*, *gag*, y *nef*, así como contra células blancas pulsadas con el péptido de la región V3 de la cepa MN, cuya secuencia estaba también presente en CR3. De esta forma se comprobó experimentalmente la capacidad de FPCR3 de inducir una respuesta de células T CD8⁺ contra diferentes proteínas del VIH. Esta propiedad se comprobó en un ensayo de ELISPOT donde se empleó como blanco la línea celular murina P815 que expresa establemente la proteína CR3. La magnitud de la respuesta inmune celular fue considerablemente mayor en esta variante del ensayo en comparación a la encontrada al usar VVCR3 para infectar las células diana. Una posible explicación para este resultado es que los epitopos CTL del VV compiten con los de CR3 por la unión a las moléculas de MHC en las células presentadoras y por tanto reducen la sensibilidad de la técnica para detectar la respuesta contra este último (Vázquez y cols, presentado a Vaccine).

Comparación de la expresión del antígeno y la respuesta de linfocitos T CD8⁺ inducida por VVAr con dos promotores poxvirales de diferentes fortalezas

Los niveles de expresión de la proteína TAB9 fueron 9.5 veces superiores en el FPSTAB9gpt que contiene el promotor sintético pE/L con relación al virus FPTAB9LZ que contiene el p7.5K. Este incremento en la expresión del virus estuvo asociado con una duplicación de la magnitud de la respuesta inmune celular medida por ELISPOT. Sin embargo una comparación similar para el gen *cr3* no arrojó diferencias en los niveles de expresión ni en la magnitud de la respuesta detectada. Estos resultados sugieren que el empleo de un promotor fuerte en la expresión del gen heterólogo no necesariamente implica el incremento sustancial de la respuesta CD8⁺, sino que esto debe ser evaluado individualmente para cada antígeno (Vázquez y cols, 2002).

Comparación entre la respuesta CTL inducida por VVA y Vaccinia Ankara Modificada (MVA). Estrategia de combinación de ambos vectores para potenciar la respuesta inmune celular

El empleo del MVA como vector vivo ha sido muy popular en los últimos años. Varios grupos han mostrado resultados interesantes en ratones o primates con estrategias combinadas de "priming" con ADN y recuerdo con MVA. Un candidato vacunal de este tipo para el subtipo A del VIH se está evaluando actualmente en Kenia y al menos otros dos están en preparación. Sin embargo, no existen reportes en la literatura de comparaciones simultáneas entre este vector con otros poxvirus aviares. En nuestro trabajo se demostró que no existían diferencias significativas entre la respuesta CTL inducida en ratones BALB/c por un MVA o VVA que expresan un antígeno similar. Además, se documentó por primera vez que la combinación de una primera dosis de MVA seguida de un recuerdo con VVA potencia significativamente la respuesta de células CD8⁺ en ratones con relación a los esquemas en que se repiten cada uno de estos

inmunógenos. Este efecto sin embargo no tiene lugar cuando se invierte el orden de los inmunógenos. Por último es de destacar que la magnitud de la respuesta inducida por la combinación MVA/VVA es superior a la tradicionalmente empleada ADN/MVA o ADN/VVA. Estos hallazgos tienen relevancia en el diseño de los futuros ensayos clínicos terapéuticos o preventivos (Vázquez y cols, presentado a Vaccine).

A manera de síntesis podemos destacar que este trabajo contiene los siguientes elementos novedosos:

1. Se han descrito en la literatura Poxvirus recombinantes para poliepitopos para CTLs, sin embargo, la novedad en la concepción del FPCR3 estriba en que CR3 no contiene epitopos exactos sino regiones ricas en epitopos para CTL ó células T auxiliaadoras, presentados en al menos 55 haplotipos diferentes. El FPCR3 es más atractivo como candidato vacunal, pues su inmunización aumenta la probabilidad de inducir una respuesta CTL en personas con diferentes haplotipos.
2. Se reporta por primera vez la obtención en ratones de una respuesta CTL potente y protectora empleando solo dos dosis del VVAr, sin combinarlo con otros inmunógenos como el ADN desnudo.
3. Se reporta por primera vez que los vectores virales basados en el VVA y en el MVA son igualmente eficientes para inducir una fuerte respuesta CD8⁺ contra un antígeno heterólogo.
4. Se reporta por primera vez que la combinación con un MVAr que expresa un poliepitopo semejante a TAB9 (MVAtab13), inmunizando inicialmente con MVAtab13 seguido de FPTAB9LZ y no en el orden inverso, induce una respuesta T CD8⁺ más potente que ambos vectores solos y que la combinación ADN/poxvirus.
5. Se demostró por primera vez que la presentación de TAB9 por un VVAr induce una respuesta T CD8⁺ en ratones contra varios epitopos del lazo V3 de diferentes aislamientos virales, pero preferentemente contra el aislamiento IIB.
6. Se reportan los primeros VVAr obtenidos en Cuba.
7. En nuestro conocimiento, constituye el primer reporte en Cuba de la inducción de una respuesta CTL restringida por MHC clase I por una inmunización experimental.

La importancia práctica radica en que constituye un aporte en la búsqueda de vacunas preventivas y terapéuticas contra el SIDA. Como parte de este trabajo se implementaron por primera vez en el CIGB y en Cuba las tecnologías para la obtención de VVAr y la medición de la respuesta CTL en un ensayo de ELISPOT de IFN- γ utilizando microplacas con membranas como soporte. También se estableció por primera vez en Cuba el modelo de reto con VV recombinante en ratones para evaluar la funcionalidad *in vivo* de la respuesta CTL.

La expresión de TAB9 a partir de un VVAr sirvió como modelo para evidenciar la utilidad de estos vectores virales como inmunógenos capaces de generar una fuerte respuesta CTL, sin la necesidad de combinarlos con otros inmunógenos. La demostración de que la combinación de VVAr con MVAr induce una respuesta CD8⁺ aún superior, convierte esta nueva estrategia vacunal en una opción muy interesante para ensayar en humanos. En especial, el hallazgo de que se

puede inducir una respuesta CD8⁺ contra varias proteínas del VIH-1 en ratones inmunizados con FPCR3, respalda la realización de un ensayo clínico donde se evalúe este vector viral como candidato vacunal terapéutico en pacientes seropositivos en combinación con la TAAE.

Colaboradores

Yordanka Soria, Dagmara Pichardo, Dioslaida Urquiza, Elina Parajón, José Suárez Alba, Karelia Cosme, Ernesto Galbán, Alejandro Martín, Víctor Jiménez, José A Silva, Regla Estrada, Osvaldo Reyes, Hilda Garay, Ismariley Revé.

1. Iglesias E, Ruiz M, Carrazana Y, Cruz LJ, Aguilar A, Jiménez V, Carpio E, Martínez M, Pérez M, Martínez C, Cruz O, Martín A, Duarte C. Chimeric proteins containing HIV-1 epitopes. *Journal Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, 2001, 5: 109-20.

2. Vázquez-Blomquist D, Green P, Laidlaw S, Skinner MA, Borrow P and Duarte CA. Induction of a strong HIV-specific CD8⁺ T cell response in mice using a fowlpox virus vector expressing

a HIV-1 multi-CTL-epitope polypeptide. *Viral Immunol* 2002;15(2):337-56.

3. Vázquez-Blomquist D, González S, Duarte CA. Effect of promoters on cellular immune response induced by recombinant fowlpox virus expressing multi-epitope polypeptides from HIV-1. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 36:1-8, 2002.

4. Vázquez-Blomquist D, Iglesias E, Gonzá-

lez-Horta EE and Duarte CA. The HIV-1 chimeric protein CR3 expressed by poxviral vectors induces a broad CTL response in mice and is antigenic for PBMCs from HIV+ patients. Enviado para su publicación en *Vaccine*.

5. Vázquez-Blomquist D, Quintana D and Duarte CA. Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) priming and Fowlpox Virus booster elicit stronger CTL response in mice against an HIV-1 peptide.