

Potencialidad inmunogénica de la proteína de la envoltura del virus Dengue 4 expresada por vía recombinante en *Pichia pastoris*

Mayra Muné¹, Rayner Rodríguez¹, Guadalupe Guzmán¹, Rosa Ramírez¹, Rosmary Rodríguez¹, Mayling Álvarez¹, Delfina Rosario¹, Susana Vázquez¹, Beatriz Sierra¹, Yudira Soto¹, Katia Valdés¹, Maritza Pupo¹, Gisset García¹, Teresita Serrano¹, Maria E Moreno¹, Tania Pumariega¹, Gerardo Guillén², Lisset Hermida², Gabriel Márquez², Laura Lazo², Rolando Páez², Raúl Martínez², José García², Carlos López², Rafael Espinosa²

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo conocer la capacidad inmunogénica de la proteína de la envoltura recombinante del virus Dengue 4 (E4rec) expresada en *Pichia pastoris*, mediante el estudio de la respuesta inmune inducida en ratones (BALB/c) y monos (*Macaca fascicularis*). Se realizó el clonaje y expresión de la proteína de la envoltura, la cual es la más importante desde el punto de vista inmunológico por su capacidad de inducción de anticuerpos neutralizantes. E4rec fue capaz de desarrollar una elevada respuesta IgG en los sueros de los ratones inmunizados. Algunos sueros individuales desarrollaron anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T específica. Los animales inmunizados fueron significativamente protegidos tras el reto con el virus salvaje (86.6% $p < 0.001$). E4rec fue igualmente inmunogénica al ser administrada en monos. Todos los animales inmunizados desarrollaron títulos de anticuerpos neutralizantes previo al reto con el virus salvaje y posterior a éste un animal fue protegido totalmente del desarrollo de viremia y dos parcialmente protegidos, los cuales desarrollaron los títulos más elevados de anticuerpos neutralizantes con respecto a los controles ($p < 0.05$). Los animales vacunados mostraron una respuesta anamnésica de anticuerpos tras el reto indicando el éxito de la inmunización. Estos resultados indican que E4rec expresada en *Pichia pastoris* provee una protección parcial contra el desarrollo de viremia en los animales inmunizados. Este estudio constituye el primer trabajo científico realizado en Cuba cuyo objetivo es la obtención y evaluación de una proteína recombinante del virus Dengue con fines vacunales, reportándose por primera vez a nivel mundial el estudio de la respuesta celular y de protección en ratones inmunizados con una proteína recombinante del virus Dengue expresada en levadura y estudios de protección con el virus salvaje. Asimismo resulta novedoso pues se reporta por primera vez, además, la inducción de protección en monos *fascicularis* de una proteína recombinante del virus Dengue expresada en *Pichia pastoris*.

Introducción

Las infecciones por virus Dengue continúan siendo hasta el presente un problema de salud pública de dimensión mundial, con una ocurrencia estimada de 100 millones de casos cada año, de los cuales unos 250 000 aproximadamente desarrollan el dengue hemorrágico y alrededor de 10 mil mueren como resultado de la infección, principalmente niños. Cerca de dos tercios de la población mundial vive en zonas infestadas con el vector del dengue, el *Aedes aegypti* [1, 2]. La diseminación de los cuatro serotipos ha facilitado el incremento de casos de Fiebre Hemorrágica del Dengue y del Síndrome de Choque por Dengue. Por estas razones actualmente se considera una enfermedad emergente y reemergente.

A pesar de los esfuerzos realizados aún no se dispone de una vacuna comercial efectiva para el dengue; por tal motivo, es necesario acelerar los esfuerzos encaminados al desarrollo de una vacuna segura y efectiva. Se han determinado varios aspectos que dificultan el proceso de obtención de una vacuna contra el virus del dengue; entre los aspectos potenciales que dificultan el proceso, se encuentran el fenómeno de amplificación de la infectividad viral mediada por anticuerpos, la ausencia de un modelo animal apropiado y barato, el entendimiento incompleto de la respuesta inmune contra el virus y la evolución viral.

Se han desarrollado varias estrategias en la búsqueda de una vacuna, identificando diferentes zonas del genoma que pueden estar involucradas en la protección, localizadas en las principales proteínas diana de la respuesta inmune, destacándose la proteína de la envoltura como la más importante desde el punto de vista inmunológico por su capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes. Entre las principales vías de obtención de una vacuna eficaz y segura la estrategia recombinante continua siendo una línea de grandes esperanzas para los investigadores que laboran en el campo de la vaccinología.

La vacuna viva atenuada convencional de primera generación, de los cuatro serotipos desarrollada en Tailandia, aún no está disponible [3]. Se plantea que por el momento no existe disponibilidad de una vacuna efectiva y que al menos se requerirán 10 años o más y aún así no podrá ser utilizada masivamente por su alto costo.

El presente trabajo forma parte del esfuerzo nacional para la obtención de una vacuna contra el dengue y tuvo como objetivo conocer la capacidad inmunogénica de la proteína de la envoltura recombinante del virus Dengue 4 (E4rec) expresada en *Pichia pastoris*, mediante el estudio de la respuesta inmune inducida en ratones (BALB/c) y monos (*Macaca*

1. Gubler SG. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol* 1998; Rev 11:480-3.

2. Chang GJ. Molecular Biology of dengue virus. In D.J Gubler and G. Kuno (ed.). *Dengue and Dengue hemorrhagic fever*. CAB International, London, United Kingdom, 1997:175-98.

3. Bhamarapravati N, Sutee Y. Live attenuated tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* 18, 2000;Suppl 2:44-7.

fascicularis). Se realizó el clonaje del gen de la envoltura truncada en 53 aa del extremo C terminal en el vector de expresión en levadura pFAO. La correcta orientación de la banda clonada se verificó mediante secuenciación del gen. El vector recombinante fue digerido y utilizado para transformar la cepa de levadura MP-36 [4]; el gen fue integrado bajo el control del promotor alcohol-oxidasa. Posterior a la expresión de la proteína E4rec, ésta fue parcialmente purificada y extraída empleando urea 8M.

El estado de glicosilación de la proteína fue analizada mediante digestión con la enzima endoglicosidasa H (Endo H). Posteriormente, el antígeno recombinante fue detectado mediante inmunomicroscopía electrónica. Grupos de 15 ratones BALB/c fueron inmunizados los días 1, 7 y 21 con 100 ug de E4rec y proteína control. Veintiocho días después de la primera inmunización se realizó la extracción de sangre y el suero fue analizado por las técnicas de ELISA, neutralización e inhibición de la hemaglutinación para la detección de anticuerpos IgG, neutralizantes e inhibidores de la hemaglutinación, respectivamente [5, 6]. La respuesta inmune celular fue igualmente analizada empleando la técnica de linfoproliferación celular (LPA) a partir de las células mononucleares de los ratones inmunizados con E4rec. Para concluir, se realizaron los experimentos de protección en los animales BALB/c previamente inmunizados con E4rec realizándose el reto con el virus salvaje (DEN4814669) mediante inoculación intracerebral de 100 LD 50 del virus.

E4rec fue semipurificada mediante cromatografía de absorción con iones metálicos (IMAC) y empleada para la inmunización de monos (*Macaca fascicularis*). De la proteína semipurificada fueron empleados 100 ug para la inmunización de tres animales los cuales fueron inmunizados cuatro veces a intervalos de 25 días por vía subcutánea. Noventa días después de la última inmunización los monos fueron retados con 10^5 (UFP) del virus Dengue 4 en un volumen de 1 mL, realizándose la extracción de sangre a intervalos regulares de 15 días para la detección de anticuerpos antidengue, aislamiento viral y reacción en cadena de la polimerasa (RCP) para la detección de secuencias del virus.

E4rec fue detectada mediante la técnica de Western Blott [7, 8] empleando líquido ascítico hiperinmune antidengue 4. Como muestra la Figura 1 el inmunoblot reveló la presencia de una banda antigénica específica de 64 kDa E4rec fue asociada con la fracción insoluble después de la ruptura celular.

Resultados

Como se observa en la tabla 1, todos los sueros de los ratones inmunizados con la proteína recombinante desarrollaron una fuerte respuesta de anticuerpos IgG contra el antígeno homólogo (Dengue 4) la cual fue detectada por ELISA. El título promedio geométrico obtenido fue de 1/141 323.

Algunos sueros individuales mostraron anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación con títulos de 1/5 a 1/20. De los sueros probados, siete desarrollaron anticuerpos neutralizantes con títulos superiores a 1/10. De los ratones inmunizados con E4rec trece animales resistieron el reto con el virus salvaje y la

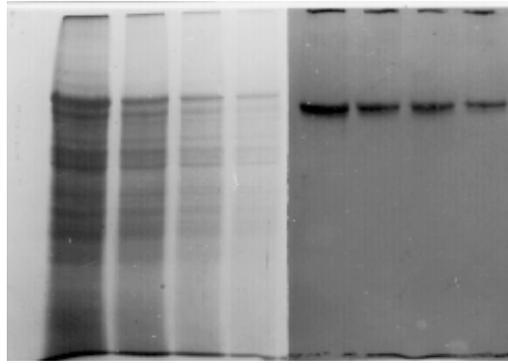


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida e inmunoblotting de la proteína E4 rec. A) Electroforesis en gel de poliacrilamida teñida con Azul de Coomassie (diluciones 1-4 hasta 1-16, respectivamente). B) Las bandas protéicas fueron separadas y transferidas a una membrana de nitrocelulosa, se realizó la revelación por reacción con un líquido ascítico hiperinmune antiviral DEN-4.

proteína recombinante indujo una buena protección contra la encefalitis letal (86.6%, $p < 0.001$).

Se obtuvo una respuesta de células T específica en los ratones inmunizados con E4rec. Los esplenocitos de los ratones inmunizados con E4rec reconocieron el virus Dengue 4 sin reactividad serotipo cruzada. Además se encontró una respuesta linfoproliferativa a E4rec en ratones inmunizados con el virus Dengue 4 lo que sugiere la presencia de epítopes inmunodominantes en la secuencia de la proteína. Estos resultados demuestran la capacidad de la proteína analizada de inducir una respuesta de células T, atributo esencial para ser considerado como un buen inmunógeno. En esta primera parte del estudio se demostró que la proteína expresada en *Pichia pastoris* fue capaz de inducir niveles de protección similares a los encontrados para otras proteínas recombinantes [9] y específicamente, la producción de anticuerpos neutralizantes, respuesta linfoproliferativa específica de células T y protección después del reto. Este trabajo constituye el primer estudio científico en el cual se evalúan los niveles de protección después del reto con el virus salvaje y la respuesta de células T en ratones inmunizados con una proteína recombinante expresada en *Pichia pastoris*. Nuestros resultados sugieren que este sistema puede ser considerado

Tabla 1. Inmunización de ratones BalbC con E4rec

Suero	ELISA	IH	NT(D4)
2	32000	1/5	+
3	256000	1/10	+
4	256000	-	+
5	128000	-	+
6	64000	-	-
7	64000	-	+
8	4000	-	+
10	256000	1/20	-
21	256000	1/20	+
22	256000	1/20	-

Protección en ratones
E4rec 13/15 (86.6%) $p < 0.001$
Control 0/15 (0%)

4. Martínez E, García C, Morales-Grillo J. Rapid transformation of non Saccharomyces yeast by electroporation. *Biotech Techn* 7, 1993:895-6.

5. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction assay for Dengue viruses by semi-micro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol*, 1985;22:250-4.

6. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg*, 1958;7:561-77.

7. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 1970: 680-5.

8. Burnette WN. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 1981;112:195-203.

9. Feighny R, Burrous J, Putnak R. Dengue type 2 virus envelope protein made using baculovirus protects mice against virus challenge. *Am. J Trop Med Hygiene*, 1994;21:322-8.

como alternativo para el desarrollo de proteínas recombinantes de Dengue.

En el estudio en monos (*Macaca fascicularis*) todos los animales inmunizados desarrollaron títulos de anticuerpos IgG mayores que los controles los días 6, 8 y 10 ($p < 0.05$ al día 6 y 10 para la técnica de ELISA y al día 10 para IHA).

La tabla 2 muestra los títulos de anticuerpos neutralizantes y títulos promedio geométricos los días 0 y 30 después del reto con el virus salvaje los monos inmunizados con E4rec mostraron el mayor título de anticuerpos neutralizantes ($p < 0.05$) con un rango de 1/85 a 1/640 el día 30. Un mono mostró un incremento del título de 2.8 veces mientras que los restantes mostraron un incremento de 7.3 y 21.3 veces, respectivamente.

La eficacia de protección de la proteína E4rec se evaluó empleando la técnica de RCP y aislamiento. En este caso no se obtuvo ningún aislamiento en cultivo celular a pesar de realizarse tres pases ciegos en la línea celular C6/36-HT por lo cual se asume la detección del ácido nucleico viral como representativa de la viremia. Un animal inmunizado fue completamente protegido de la viremia, mientras que los otros dos animales restantes fueron parcialmente protegidos. Los monos inmunizados con la levadura control desarrollaron viremia que fue detectada por la técnica de RCP. La media de duración de la viremia fue de 9.33 días para los animales controles y de 4 días para los animales inmunizados. Ningún animal desarrolló signos de enfermedad.

Para concluir este acápite podemos decir que fue evaluada la eficacia de la proteína E4rec en monos, lo cual constituye el primer reporte que extiende la evaluación de una proteína recombinante expresada en *Pichia pastoris* de ratones a monos. La proteína fue inmunogénica en monos *fascicularis* protegiendo completamente uno de los tres animales inmunizados y reduciendo el tiempo de la viremia en otros. Los animales inmunizados mostraron respuesta anamnésica de anticuerpos después del reto con el virus salvaje indicando el éxito de la inmunización con la proteína recombinante. Aunque los anticuerpos neutralizantes fueron testados solo los días 0 y 30 después del reto, la rápida amplificación de los anticuerpos observada en los animales inmunizados después del reto y las características del ELISA indican una respuesta anamnésica y además la funcionalidad de los anticuerpos. Aparentemente E4rec no fue capaz de proteger completamente a todos los animales vacunados, algunos factores o combinación de ellos tales como las diferencias conformacionales entre una proteína recombinante y la proteína nativa. La presentación del antígeno o el esquema de inmunización aplicado pudieran influir en este hallazgo a pesar de la buena protección obtenida anteriormente en ratones inmunizados con E4rec. Se ha demostrado que los anticuerpos neutralizantes son importantes para la protección contra la infección por el virus del dengue, similar a lo

Tabla 2. Títulos de los anticuerpos neutralizantes en monos inmunizados a los días 0 y 30 después del reto con virus Dengue 4

		0	30	TPG
E4rec	D1	30	640	
	D2	30	85	228
	D	30	220	
Control	D8	0	45	
	D9	0	20	43
	D10	0	92	

> Un animal mostró un incremento de 2.8 veces en el título de Acs Nt

> Los otros un incremento de 7.3 y 21.3 veces

Día 30

$p < 0.05$

reportado por otros autores, la presencia de los anticuerpos neutralizantes en nuestro caso no se correlacionó con la protección a la viremia, todos los animales inmunizados tenían el mismo título de anticuerpos neutralizantes (1/30) en el momento del reto sin embargo no se protegieron de manera uniforme probablemente porque la respuesta humoral y celular obtenida no fue suficiente a pesar del rápido incremento de anticuerpos observado después del reto [10-12].

Este trabajo constituye el primer reporte científico del estudio en monos de inmunogenicidad de una proteína recombinante del virus Dengue expresada en *Pichia pastoris*. Hasta el presente no ha sido reportado en la literatura científica un estudio completo de la respuesta inmune humoral y celular en ratones y estudio de protección en monos empleando una proteína recombinante de dengue expresada en *Pichia pastoris* lo cual refleja la novedad científica del trabajo ya que aporta interesantes datos que serán de gran utilidad futura y deben tenerse en cuenta para el desarrollo de nuevas estrategias en la obtención de una vacuna contra la enfermedad.

Conclusiones

·La proteína recombinante fue expresada en el sistema *Pichia pastoris*, el tratamiento con endoglicosidasas mostró que la proteína fue modificada por la adición de cadenas cortas de manosa y ausencia de hiperglicosilación.

·E4rec fue inmunogénica cuando se administró a ratones BALB/c, induciendo anticuerpos neutralizantes y una respuesta de células T específica.

·Los ratones fueron protegidos frente al reto con virus Dengue 4 (86.6%, $p < 0.001$).

·E4rec fue igualmente inmunogénica al ser administrada en monos. Un animal fue protegido totalmente y dos parcialmente protegidos (reducción de viremia).

·Los animales vacunados mostraron respuesta anamnésica después del reto.

·El animal protegido totalmente desarrolló los niveles más bajos de anticuerpos después del reto. El animal con la viremia mayor desarrolló los títulos más elevados de anticuerpos Nt (tanto IgM como IgG).

10. Men R, Wyatt L, Tokimatsu I, Arakaki S, Shameem G, Elkins R, Chanock R, Moss B, Lai CJ. Immunization of rhesus monkeys with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*, 2000;18: 3113-22

11. Kochel TJ, Raviprakash K, Hayes CG, Watts DM, Russell KL, Gonzalo AS, Phillips IA, Ewing DF, Murphy GS, Porter KR. A dengue serotype-1 DNA vaccine induces virus neutralizing antibodies and provides protection from viral challenge in Aotus monkeys. *Vaccine* 18, 2000:3166-73.

12. Scott RM, Nisalak A, Eckels KH, Tingpalapong M, Harrison VR, Gould DJ, Chapple FE, Russell PK. Dengue-2 vaccine: viremia and immune responses in rhesus monkeys. *Infect Immun*, 1980;27:181-6