

Inmunización con fragmentos de ADN para el estudio de la respuesta contra antígenos de *Neisseria meningitidis*

REPORTE

✉ Daniel Yero¹, Sonia González², Maikel Acosta³, Karem Cobas², Evelín Caballero², Mildrey Fariñas¹, Yusleydis Pérez², Daiyana Díaz¹, Brizaida Oliva², Olivia Niebla², Yamilé López¹, Armando Acosta¹, María Elena Sarmiento¹, Gustavo Sierra¹, Franklin Sotolongo¹, Rosa L Solís¹, Gerardo Guillén², Concepción Campa¹

¹Instituto Finlay
Ave. 27 No. 19805, AP 16017, CP 11600, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba
²División de Vacunas, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
³Departamento de Virología, Facultad de Biología, Universidad de La Habana, UH
E-mail: dyero@finlay.edu.cu

Introducción

Cada año se reportan aproximadamente 1.2 millones de casos con enfermedad meningocócica en el mundo, con un estimado de 170 000 muertos y un grupo que queda con secuelas permanentes [1]. A pesar de que existen vacunas basadas en polisacáridos contra cuatro serogrupos de *Neisseria meningitidis* (A, C, Y y W135) [1], las estrategias para desarrollar vacunas contra el serogrupo B basadas en el antígeno capsular han fallado por su poca inmunogenicidad en humanos. Los intentos de desarrollo de una vacuna contra este serogrupo se han enfocado en antígenos de superficie no capsulares, como las proteínas de membrana externa (PME), que se han evaluado individualmente o formando parte de vesículas de membrana externa (VME). El primer estudio que brindó información sobre la efectividad y seguridad de un preparado vacunal basado en VME se desarrolló en Cuba con la vacuna antimeningocócica VA-MENGOC-BC[®] [2, 3]. Sin embargo, aún cuando las VME inducen inmunidad protectora contra diferentes cepas del meningococo, la respuesta inmune se puede mejorar con la inclusión de nuevos adyuvantes o enriqueciendo su formulación con antígenos conservados.

Recientemente se han empleado técnicas de la genómica y la proteómica para identificar nuevos antígenos minoritarios conservados entre todos los aislamientos [4], aunque aún no hay resultados palpables. A su vez, se trabaja por mejorar las preparaciones vacunales basadas en estos antígenos, y se emplean nuevas rutas de administración, técnicas de inmunización y adyuvantes, y teniendo en consideración también la importancia de la inmunidad celular en la respuesta inmune contra el meningococo [5]. Acorde con estos propósitos, la inmunización con segmentos de ADN ofrece una nueva posibilidad para evaluar antígenos proteicos. Este método de inmunización se basa en la inoculación directa del gen que codifica para el antígeno en el tejido del hospedante, en lugar de inyectar la proteína correspondiente [6]. Las facilidades de la inmunización con ADN han permitido que, en un período relativamente corto, en un modelo animal se puedan evaluar tantos genes como se requiera, mediante la inmunización con bibliotecas de expresión (ELI, del inglés *Expression Library Immunization*) [7]. La inmunización con ADN estimula todas las vías efectoras del sistema inmune: ventaja adicional para un estudio completo de la respuesta del hospedero hacia este

agente patógeno. En este artículo se exponen los resultados del Departamento de Vacuna Antimeningocócica del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Finlay, tras el empleo de ELI por primera vez como alternativa para estudiar la respuesta inmune contra el meningococo.

Construcción del vector pELI3.1

Para la construcción de una biblioteca genómica óptima (eficiente y representativa), se diseñó un nuevo vector de expresión para inmunización con ADN, que se denominó pELI3.1 [8] (Figura 1). La expresión con este nuevo vector se llevó a cabo bajo el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano y con las secuencias de poliadenilación y procesamiento del ARN mensajero del antígeno t del virus de simios SV40. Algunos elementos novedosos de esta investigación son: a) Se incorporó la selección de recombinantes mediante el método de colonias blancas y azules; b) Se adicionó la secuencia Kozak antes del primer triplete de la traducción para la óptima expresión en células eucariontes; c) Se amplió el sitio múltiple de clonación (SMC) al adicionar además los sitios *Bam*H I, *Bcl* I y *Bgl* II en los diferentes marcos de lectura, compatibles con la enzima *Sau*3AI; d) A ambos lados del SMC se adicionaron secuencias donde hibridan los oligonucleótidos universales M13, para la secuenciación de

1. Mitka M. New vaccine should ease meningitis fears. *JAMA* 2005;293(12):1433-4.
2. Sotolongo F, Campa C, Casanueva GV, Fajardo EM, Cuevas I, González N. Cuban Meningococcal BC Vaccine: Experiences & Contributions from 20 Years of Application. *MEDICC Review* 2007;9(1):16-22.
3. Sierra GV, Campa C, Varcacel NM, García IL, Izquierdo PL, Sotolongo PF, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. *NIPH Ann* 1991;14(2):195-207.
4. Bernardini G, Braconi D, Martelli P, Santucci A. Postgenomics of *Neisseria meningitidis* for vaccines development. *Expert Rev Proteomics* 2007;4(5):667-77.
5. Pérez O, Lastré M, Lapinet J, Bracho G, Díaz M, Zayas C, et al. Immune response induction and new effector mechanisms possibly involved in protection conferred by the Cuban anti-meningococcal BC vaccine. *Infect Immun* 2001;69(7):4502-8.
6. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000;18:927-74.
7. Barry MA, Howell DP, Andersson HA, Chen JL, Singh RA. Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens. *Immunol Rev* 2004;199:68-83.

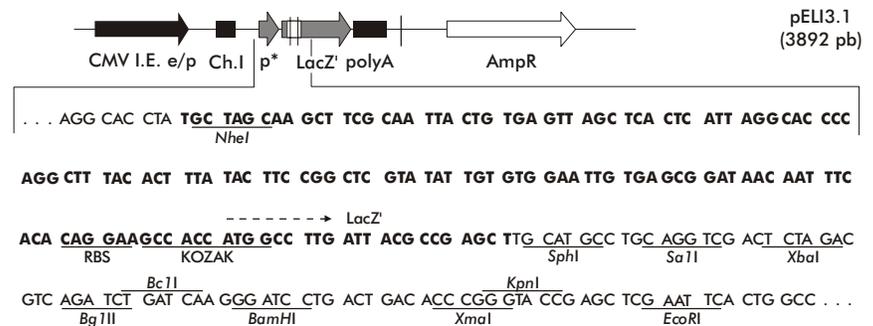


Figura 1. Esquema del vector pELI3.1. Secuencia del sitio de clonación múltiple (MCS): los sitios de restricción aparecen subrayados, al igual que el sitio de inicio de la traducción en bacteria (RBS) y en eucariontes (Kozak). CMV I.E. e/p: promotor del citomegalovirus humano; Ch.I: intrón químérico; p*: promotor del operón lactosa; LacZ': gen de la subunidad alfa de LacZ; polyA: señal de poliadenilación; AmpR: gen de resistencia a ampicilina (AmpR); pb: pares de base.

los segmentos insertados; e) Se redujo la talla del plásmido a 3892 pb, para que aumentara su capacidad de inserción y transfectante.

Construcción y evaluación de una biblioteca genómica anotada de *N. meningitidis* en ratones

Una vez construido y evaluado el nuevo vector, se procedió a construir una genoteca anotada de *N. meningitidis*. Se tomó ADN cromosomal de la cepa CU385 y se digirió parcialmente (1U/μg ADN durante 5 min a 37 °C) con la enzima *Sau3AI*. El ADN digerido se ligó en tres reacciones separadas al vector pELI3.1 digerido con las enzimas *BglII*, *BamHI* y *BclI*, respectivamente. Con las reacciones de ligamiento se transformaron células de *Escherichia coli* TOP10, que se colocaron en placas en un medio sólido selectivo suplementado con X-Gal e IPTG, e incubaron para el crecimiento de las colonias. A continuación de forma manual se seleccionaron 6000 colonias blancas, que se salvaron en placas de 96 pocillos. Cada pozo contenía medio 2xYT y cada clon creció durante 6 h. Posteriormente se adicionó glicerol (concentración final del 15%) y se guardó cada placa a -70 °C. Cada placa se consideró placa madre y se utilizó para hacer réplicas. Cada una de ellas se utilizó para inocular cultivos de mayor volumen de medio Luria-Bertani (LB), donde los clones se mezclan. Previo al cultivo cada placa réplica, se creció 6 h para garantizar que cada clon iniciara su crecimiento con una biomasa equivalente, y evitar así el crecimiento acelerado de unos clones sobre otros. Finalmente, se purificó el material plasmídico que contenía 6000 clones, mediante sistemas de purificación de plásmidos libres de pirógenos (Qiagen, Canadá). La biblioteca de 6000 clones se utilizó para inmunizar ratones Balb/c por vía intramuscular con cuatro dosis de 100 μg de ADN cada una. Mediante las técnicas de *Western Blot* y ELISA, se detectó la respuesta de anticuerpos específicos de tipo IgG. Adicionalmente hubo actividad bactericida en los sueros de los ratones inmunizados con la biblioteca total (título 1:16) [8]. La inducción de anticuerpos bactericidas es el criterio avalado por las agencias reguladoras internacionales que evalúan la efectividad de una vacuna antimeningocócica (títulos > 1:8 se considera positivo). Se tomaron los ganglios linfáticos inguinales de tres animales de cada grupo y se purificaron los linfocitos para experimentos de linfoproliferación contra VME (5 μg/pozo) o células totales lisadas del meningococo (5 μg/pozo). Los grupos inmunizados con la biblioteca mostraron índices de estimulación mayores de 3 (5.4 ± 0.9 contra el lisado y 5.5 ± 1.7 contra VME), al igual que los grupos inmunizados con la vacuna comercial cubana (5.1 ± 1.0 contra el lisado y 3.5 ± 0.8 contra VME). Estos resultados demostraron que es posible seguir inmunizando con fracciones cada vez menores de la biblioteca total, que contiene clones cuyas secuencias codifican para polipéptidos del meningococo con efectos inmunoestimulantes.

Fraccionamiento de la biblioteca genómica anotada

La construcción de una biblioteca genómica anotada (genoteca) permitió continuar fraccionando la biblioteca total de 6000 clones. La estrategia consistió en construir 10 subgenotecas de 600 clones cada una.

Para ello se tomaron réplicas de grupos de 6 placas madre y se utilizaron para inocular un cultivo en un medio LB (como se describió antes). El material plasmídico de las 10 subgenotecas se utilizó para inmunizar ratones Balb/c en un esquema similar al de la biblioteca total. Tres de las 10 subgenotecas (L6, L8 y L9) indujeron la producción de anticuerpos con actividad bactericida y, de estas, la subgenoteca L8 mostró protección en el modelo de bacteriemia en rata infante (reducción significativa del número de colonias). Con algunas de las subgenotecas se indujeron anticuerpos IgG, detectados por *Western Blot*, particularmente en el suero de los ratones inmunizados con la subgenoteca L8, que reconoció una banda definida en preparaciones de VME. Luego, se dividió la subgenoteca L8 en 6 subgenotecas de 95 clones cada una, denominadas L8A, L8B, L8C, L8D, L8E y L8F. Estas se utilizaron para inmunizar ratones Balb/c, y se indujo respuesta de anticuerpos bactericidas (1:8) en los sueros de los ratones inmunizados con L8-C. A continuación se combinaron dos a dos estas subgenotecas, y se evaluaron en un nuevo esquema de inmunización. La combinación de L8C y L8D indujo los mayores títulos bactericidas y promovió la protección en el modelo de ratas infantas.

Identificación de candidatos vacunales contra *N. meningitidis* mediante inmunización genómica

En este estudio también se demostraron las potencialidades de la inmunización con ADN para identificar nuevos antígenos involucrados en una respuesta contra *N. meningitidis*. Para ello, se partió de las subgenotecas L8C y L8D, que habían inducido respuesta inmune protectora. El ADN en cada uno de los 190 clones seleccionados se secuenció y analizó mediante procedimientos de bioinformática. Se determinó que 20 de ellos expresaban polipéptidos del meningococo, pues el inserto de ADN se encontraba en el marco de lectura correcto en el plasmidio pELI3.1. Con estos 20 plasmidios se continuó el estudio, por ser los potencialmente responsables de la respuesta observada tras la inmunización con los dos grupos de 95 clones [9]. Se pudo determinar que estos plasmidios codificaban para ocho proteínas de membrana externa, una proteína periplasmática y once citosólicas (Tabla 1). Una de ellas, expresada por el clon 3E9, es una típica proteína conservada de la membrana externa y, por tanto, un atractivo candidato vacunal.

Evaluación de un grupo de plasmidios candidatos vacunales contra *N. meningitidis* en ratones

Después de aplicar el método de selección basado en inmunización con ADN (ELI), se inocularon ratones con diferentes combinaciones de los plasmidios identificados anteriormente. Un grupo se inculó con la mezcla de los 20 plasmidios (L8CD), otros dos grupos con los clones pertenecientes a cada placa (L8C y L8D), otro grupo con los ocho clones codificantes para proteínas de membrana (L8-OMP); otro, solo con el plasmidio derivado del clon 3E9 y un grupo control con el plasmidio sin inserto (Tabla 1). Se administraron cuatro dosis de 100 μg de ADN a cada animal, espaciadas tres semanas entre una y otra. Los sueros extraídos

8. Yero CD, Pajón FR, Caballero ME, Cobas AK, López HY, Farinas MM, et al. Immunization of mice with *Neisseria meningitidis* serogroup B genomic expression libraries elicits functional antibodies and reduces the level of bacteremia in an infant rat infection model. *Vaccine* 2005; 23(7):932-9.

9. Yero D, Pajón R, Pérez Y, Farinas M, Cobas K, Díaz D, et al. Identification by genomic immunization of a pool of DNA vaccine candidates that confer protective immunity in mice against *Neisseria meningitidis* serogroup B. *Vaccine* 2007; 25(28):5175-88.

Tabla 1. Antígenos identificados después de aplicar el protocolo de inmunización con fragmentos de ADN derivados de una biblioteca genómica de *Neisseria meningitidis* cepa CU385

Clon	Placa origen	Nombre de la proteína que codifica y función probable detectada por homología	Localización en la célula	Grupos de inmunización*
3B1	L8C	Transposas a IS5	Citoplasma	A B
3E9	L8C	Lipoproteínas de membrana	Membrana externa	A B C D E
3F1	L8C	ClpA, ATPasa con actividad chaperona	Citoplasma	A B
3F4	L8C	Dominio YCII con actividad enzimática	Citoplasma	A B
3F10	L8C	Proteína hipotética	Desconocida	A B
3G3	L8C	Proteína hipotética	Membrana externa	A B D
3G7	L8C	Dominio HesB involucrado en la fijación de nitrógeno	Citoplasma	A B
3G9	L8C	Fosfotransferasa a deniltransferasa	Citoplasma	A B
4A1	L8D	Receptor de membrana externa para coprógeno férrico	Membrana externa	A C D
4A6	L8D	LuxS, censor autoinducible de nivel de población	Citoplasma	A C
4A8	L8D	MurC, UDP-N-acetilmuramato-alanina ligasa	Citoplasma	A C
4A10	L8D	Proteína ResB, biosíntesis de citocromo C	Membrana interna	A C
4A11	L8D	AdhC, alcohol deshidrogenasa dependiente de Zn	Citoplasma	A C
4D4	L8D	Adhesina AidA, vía de secreción tipo V	Membrana externa	A C D
4E5	L8D	Porina PorA	Membrana externa	A C D
4F2	L8D	Hemaglutinina	Membrana externa	A C D
4F11	L8D	Guano sinapilifosforiltransferasas/sintetasas	Citoplasma	A C
4G2	L8D	Toxina RTX, proteínas relacionadas con la unión de Ca ⁺⁺	Membrana externa	A C D
4H1	L8D	DapB, dihidrodipicolinato reductasa	Citoplasma	A C
4H10	L8D	Sistema de transporte de Co ⁺⁺ tipo ABC	Periplasma	A C D

Las letras refieren los clones incluidos en cada inmunógeno.

A: grupo de los 20 clones juntos.

B, C: grupos con los clones pertenecientes a las placas L8C y L8D, respectivamente.

D: grupo de los 8 clones de proteínas de membrana.

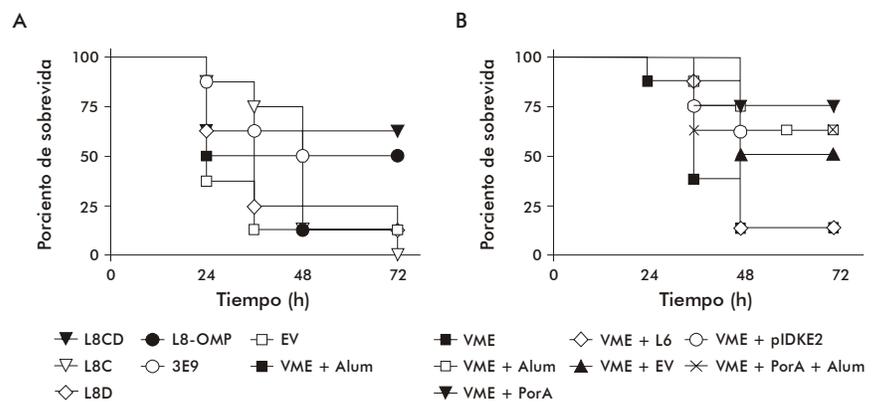
E: grupo tratado con el plasmidio derivado del clon 3E9.

de los grupos de ratones inmunizados con el conjunto de los 20 clones o con los clones derivados de la placa L8D, fueron los únicos que mostraron actividad bactericida. La respuesta inmune no solo fue contra la cepa homóloga, sino también contra una cepa de otro serogrupo. Esta funcionalidad se verificó, además, en un ensayo *in vitro* de deposición de complemento humano sobre la superficie de la bacteria, el cual se determinó por citometría de flujo. Estos dos sueros fueron protectores en un modelo de reto e inmunización pasiva en ratas infantiles. Por último, se retaron con aproximadamente 2×10^7 unidades formadoras de colonias (ufc) de meningococos de la cepa homóloga, todos los ratones inmunizados (Figura 2A). Aquellos que se inmunizaron con la mezcla de 20 clones y el grupo inoculado con el clon 3E9, mostraron protección parcial (> 50% de supervivencia), mientras que los otros grupos y el control no (< 20%) [9].

Estrategia de inducción-reestimulación para el estudio de la respuesta inmune contra *N. meningitidis*

Para la inducción-reestimulación se utilizó el gen PorA de la cepa CU385 del meningococo y diferentes estrategias de vacunación. Se demostró la capacidad de este tipo de inmunización como estímulo primario para las células del sistema inmune, mediante una estrategia en la que se inmuniza primero con ADN seguido de una dosis de refuerzo con proteína (inducción-reestimulación). Después de inocular tres veces a los ratones de un grupo, con un plasmidio que codifica para PorA (pELI-PorA), se les administró una dosis de refuerzo con VME del meningococo (contiene a la proteína PorA en estado nativo) y a otro grupo, con PorA recombinan-

te. Los animales que recibieron las VME como refuerzo, mostraron mayores títulos de anticuerpos contra la proteína PorA ($p < 0.05$) y contra VME ($p < 0.05$), con respecto a los grupos controles inmunizados antes del refuerzo con el vector vacío o con solución salina tampón. Este resultado sugiere que es posible aumentar la respuesta inmune contra una proteína del meningococo mediante un esquema de inmunización que combine la inyección de ADN con la inoculación de la



proteína correspondiente. No hubo diferencias en el título de anticuerpos en el grupo reestimulado con PorA, con respecto a los grupos controles después de cada inmunización. Sin embargo, hubo diferencias en el balance de subclases de anticuerpos inducidos entre los grupos inmunizados. Después de administrar la dosis de reestimulación con la proteína PorA, el balance de títulos de subclase IgG2a/IgG1 contra PorA fue 4.5 para los animales previamente inoculados con pELI-PorA, mientras que para los grupos controles este balance fue 1. Todos estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores, sobre el uso de la inmunización con ADN para favorecer la producción de células B de memoria más que de células B efectoras. Este esquema de inoculación que combina inmunógenos de tipo ADN y proteína no se había explorado antes en el estudio de la respuesta contra antígenos de *N. meningitidis*. Con esta combinación de inmunógenos se indujeron títulos bactericidas superiores en los animales inmunizados con pELI-PorA, probablemente debido al predominio de anticuerpos de isotipo IgG2a hacia la porina PorA. Estos títulos bactericidas fueron significativamente superiores (dos diluciones mayor) dos semanas después de administrar la dosis de refuerzo con PorA. Los resultados demostraron que es posible modificar la respuesta inmune hacia un antígeno del meningococo mediante el uso combinado de la inmunización con ADN seguido por reestimulación con proteínas.

Estrategia de inducción-reestimulación como estrategia de búsqueda de candidatos vacunales

Se exploró nuevamente la estrategia de inducción-reestimulación, con un nuevo esquema de inmunización en el que a los animales se les administraron combinaciones aleatorias de clones derivados de una genoteca de *N. meningitidis*, seguido de una dosis de refuerzo con VME. Esta genoteca se obtuvo por fraccionamiento aleatorio del ADN cromosomal de la cepa CU385. Luego de esta maniobra combinada, se extrajo suero de los ratones y se determinaron los títulos de anticuerpos contra VME. No hubo diferencias significativas en el nivel de anticuerpos, pero al igual que en la estrategia anterior, sí se observaron diferencias en la actividad bactericida de estos. Con dos de las combinaciones de clones usadas como inmunógeno primario, se obtuvo respuesta inmune bactericida y protectora contra *N. meningitidis* en modelos animales. Cuando se evaluaron estos sueros en un ensayo tipo *Western Blot*, se observó un patrón de reconocimiento de proteínas del meningococo al inmunizar plasmidios de ADN codificantes para antígenos, diferente a si se hubiera inoculado primero un plasmidio vacío. Con estos resultados se planteó una nueva estrategia de búsqueda de candidatos vacunales, basada en la combinación de dosis primarias con genotecas y una dosis de refuerzo con proteínas del agente patógeno del cual se obtuvo la genoteca [10].

Efecto adyuvante de diferentes moléculas de ADN para las VME del meningococo

En otro experimento se investigaron las potencialidades de los vectores obtenidos en este trabajo, para su

uso posterior en formulaciones en las que se co-administran las VME con ADN plasmídico. En esta estrategia de inmunización se inyectó VME sin adyuvante, VME combinadas con el vector pELI-PorA, un plásmido con un gen no relacionado (pIDKE2), un subgrupo de clones de la biblioteca genómica (L6), o con el vector vacío pELI3.1, a ratones Balb/c. Como control positivo se emplearon ratones inmunizados con VME adyuvadas en gel de alúmina. En todos los casos en que se hicieron combinaciones, se administraron iguales cantidades de ADN y vesículas (5 mg de cada uno) y los ratones se inmunizaron con 3 dosis de cada una de las formulaciones. En el título de anticuerpos medido por ELISA indirecto contra VME o contra PorA entre los grupos a los que se administró las VME junto con ADN plasmídico, en comparación con el grupo tratado con VME sin adyuvante, se observaron diferencias estadísticamente significativas. También en los grupos inmunizados con vesículas mezcladas con el vector vacío o con pELI-PorA, se verificó un equilibrio entre IgG2a e IgG1, a diferencia del predominio de subclase IgG1 después de la segunda dosis en los ratones inmunizados con VME sin adyuvante. La inmunización con VME en alúmina induce un patrón IgG2a/IgG1 con un balance igual a 1, similar al observado después de inmunizar con las combinaciones de ADN y VME, lo que corrobora que el ADN plasmídico pudiera ejercer un efecto adyuvante para las VME. Estos resultados no superaron a los correspondientes a VME más alúmina, pero demostró que el ADN pudiera ser un adyuvante adecuado para antígenos de las VME que por sí solos son poco inmunogénicos. Después de 3 dosis no se evidenciaron títulos de anticuerpos bactericidas en los animales inmunizados con las vesículas sin adyuvante. Sin embargo, la coadministración de cualquier plásmido empleado aumentó estos títulos a niveles comparables con los inducidos después de inyectar las VME con alúmina, a partir de la segunda dosis. Un mes después de la última dosis, se retaron los animales con la cepa homóloga, para determinar el nivel de protección conferido por cada inmunógeno diseñado. Después del reto con aproximadamente 2×10^7 ufc de meningococos de la cepa homóloga, el 75% de los animales inmunizados con la combinación pELI-PorA más VME sobrevivieron, mientras que el 90% de los que recibieron las VME sin adyuvante murieron. En los grupos inmunizados con pELI3.1 más VME o con VME en alúmina sobrevivió el 50 % de los ratones (Figura 2B). Con este resultado se demuestra por primera vez el poder adyuvante del ADN para las VME del meningococo.

Conclusiones

Los resultados a lo largo de este trabajo demuestran que es posible modificar la respuesta inmune hacia antígenos proteicos o hacia las VME de *N. meningitidis* mediante estrategias de inoculación que exploren la inmunización con ADN. Además, la inmunización con ADN como plataforma de búsqueda de antígenos candidatos vacunales es aplicable al meningococo, y una estrategia nueva, basada en la inducción-reestimulación de la respuesta inmune amplía las posibilidades de búsquedas de antígenos con esta plataforma.

10. Yero D, Pajón R, Caballero E, González S, Cobas K, Farinas M, et al. A novel method to screen genomic libraries that combines genomic immunization with the prime-boost strategy. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007;50(3):430-3.