

Expresión del antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo B por un virus *Vaccinia* recombinante

R. ALVAREZ, P. RODRÍGUEZ, J. DE LA FUENTE y L. HERRERA

Agrupación de Genética de Células de Mamíferos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Apartado 6162, La Habana, Cuba

Recibido en marzo de 1988

RESUMEN

El virus *Vaccinia* ha sido empleado como vector para la fabricación de vacunas recombinantes vivas, entre las cuales se ha reportado la fabricación de un virus recombinante capaz de expresar el antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo B (HBSAg) durante el proceso de replicación del virus.

En nuestro laboratorio se construyó un virus *Vaccinia* recombinante, también capaz de expresar el HBSAg. Los transcritos específicos de HBSAg fueron caracterizados.

La propiedad del virus *Vaccinia* recombinante de expresar el HBSAg, fue probada en ratones y conejos, obteniéndose en estos animales títulos de anticuerpos contra el HBSAg después de haber sido inoculados con los virus recombinantes.

SUMMARY

Two millions of deaths occur every year in the world as a consequence of the Hepatitis B infection. That is why many laboratories are working in order to obtain a vaccine against the Hepatitis B Surface Antigen (HBSAg).

In our lab we have constructed a *Vaccinia* Virus expressing the HBSAg. The specific transcripts were characterized.

The recombinant *Vaccinia* Virus was tested in mice and rabbits. Specific antibodies against the HBSAg were obtained.

INTRODUCCION

Varios son los estudios que se están realizando para la utilización del virus *Vaccinia* como un agente intermediario en la protección del hombre y animales contra el antígeno de superficie del virus de la hepatitis tipo B (Smith *et al.*, 1983a); la glicoproteína D del virus del herpes simplex (Paoletti *et al.*, 1984); la hemaglutinina del virus de la influenza (Panicali *et al.*, 1983; Smith *et al.*, 1983c); la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (Mackett *et al.*, 1984); la malaria (Smith *et al.*, 1984) y la glicoproteína de la rabia (Kieny *et al.*, 1984; Wiktor *et al.*, 1984).

La utilización del virus *Vaccinia* se basa en el amplio conocimiento que se tiene acerca de su biología (Moss, 1974; Andrewes *et al.*, 1967; Joklik, 1980); en que posee un ADN de doble cadena con un tamaño de 187 Kb capaz de aceptar en su interior hasta 25 Kb de ADN extraño (Smith y Moss, 1983b); en la pérdida de infectividad del ADN aislado, lo que facilita su manipulación (Mackett *et al.* 1982), y la demostración de que en ratones, el virus recombinante timidina quinasa negativo (TK-) en igualdad de concentración tiene un efecto menos letal que el virus salvaje (Buller *et al.*, 1985).

En el presente trabajo nosotros describimos la construcción de un virus *Vaccinia* recombinante similar al descrito por Smith en 1983, capaz de expresar el HBSAg bajo el control del promotor de la proteína 7,5 K.

Estos virus recombinantes fueron inoculados a células de cultivo para caracterizar los transcritos de HBSAg producidos.

La inoculación de animales permitió estudiar la cinética de aparición de anticuerpos contra el antígeno de superficie.

MATERIALES Y METODOS

Enzimas de restricción

Para realizar este trabajo se utilizaron enzimas de restricción Eco RI, Sma I, Hind II, Hind III, y las enzimas de modificación ADN T4 ligasa y ADN polimerasa fragmento Klenow, todas producidas por ENZIBIOT (CIGB, Cuba). Las condiciones utilizadas fueron las recomendadas por la casa comercial.

Preparación de los plasmidios

El plasmidio utilizado en la transfección fue preparado a partir del plasmidio PRE, que contiene el gen TK del virus *Vaccinia* (Dennis y Balli, 1981), el promotor temprano y tardío 7,5 K de este (Sundarajan y Moss, 1981), y el multisitio y origen de replicación del PUC 19, al cual se le insertó en su único sitio Eco RI y bajo el promotor 7,5 K, la región S (800 pb) obtenida del plasmidio HBS2 (De la Riva *et al.*, II Seminario sobre Interferón y I sobre Biotecnología, febrero 1986, La Habana, Cuba; en prensa).

Obtención del ADN viral

Células 143B (osteosarcoma humano), se crecieron hasta semiconfluencia en botellas de roller de 1 800 cm², se infectaron con 0,05 unidades formadoras de placas (UFP) por células y se mantuvieron durante 48 horas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5%, momento en el cual las células se desprendieron por tripsinización y se concentraron por centrifugación a 750 g por 5 minutos.

El pellet obtenido se resuspendió en 1:20 de volumen de cultivo con solución tris 10 mM, pH 9. Esta resuspensión densa se congeló y descongeló tres veces y se volvió a centrifugar a 750 g por 5 minutos. Se recuperó el sobrenadante y el pellet se reextrajo, con igual volumen, de la solución anterior. Ambos sobrenadantes fueron unidos e incubados con 2,5 mg/ml de tripsina (Gibco) por 30 minutos, a 37°C.

Posteriormente este super de centrifugación se puso sobre igual volumen de sacarosa al 36% en tris 10 mM, pH 9 y se centrifugó a 25 000 g por una hora y 20 minutos; a 4°C. El pellet que contenía las partículas virales fue tratado para la liberación del ADN en una reacción de tris-HCL 50 mM pH 8, EDTA 1 mM, SDS 1%, sacarosa al 27% y pronasa autodigerida 500 µg/ml durante una hora, a 37°C.

A este material se le realizaron dos extracciones con fenol y dos con fenol:cloroformo, y el ADN fue precipitado con etanol, extraído con pipeta y resuspendido en 10 mM de tris y 1 mM EDTA. Los pasos de precipitación y resuspensión fueron repetidos dos veces.

Obtención del ARN viral

Se infectaron células 143B a una multiplicidad de infección de 10 UFP por célula con virus *Vaccinia* tipo salvaje y recombinante en presencia de cicloheximida a una concentración de 100 µg/ml durante cuatro horas a 37°C. De esta forma, el ARN aislado se corresponde con el ARN expresado tempranamente.

Estas células infectadas fueron lisadas con solución 6 M urea, 3 M LiCl, 0,05 M NaOAc, 200 µg/ml de heparina y 0,1% SDS por ocho horas a 4°C. Dicho lisado fue pasado por jeringa y precipitado el ARN con 8 M urea y 4 M LiCl en hielo por 8 horas. El precipitado fue recolectado por centrifugación y resuspendido en 300 µl de 0,02 M

de Tris HCl, pH 7,5. Posteriormente le fueron realizadas dos extracciones con fenol y fenol:cloroformo, seguidas de una precipitación etanólica.

Transfección y selección

En la transfección (figura 1), fue utilizada la línea celular CV1 (de riñón de mono verde africano), cultivada en medio DMEM (Gibco) con 5% de suero fetal bovino (Cubavet), 2% L-glutamina (Gibco) y gentamicina a 40 mg por litro. Las células fueron crecidas hasta semiconfluencia e infectadas con virus *Vaccinia* fenotipo salvaje a una multiplicidad de infección de 0,05 UFP/célula; transcurrida una hora, a 37°C se le extrajo este inóculo y se le añadió un precipitado de ADN preparado según Kaufman *et al*, 1985, y con varias modificaciones para el trabajo con virus, dicho precipitado contenía al plásmido recombinante. Entre las modificaciones se encuentran la incubación, con 0,05 UFP/célula durante dos horas como paso inicial en la transfección; no se realizó el shock de glicerol al 10% pues dejaba en muy mal estado a nuestras células y el momento de recogida de la transfección estuvo dado por la existencia de efecto citopático.

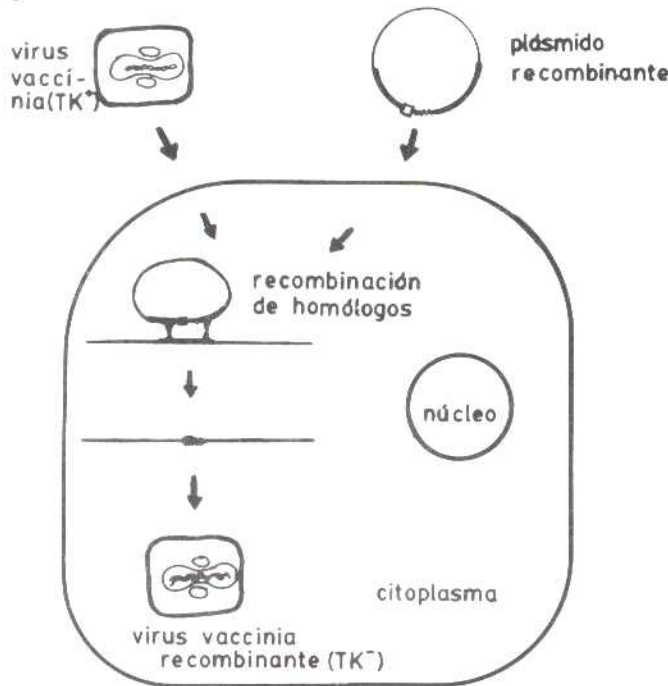


FIG. 1. Esquema de la recombinación *in vivo*.

La selección de los virus *Vaccinia* recombinantes con fenotipo TK-, se realizó por el aislamiento de placas de lisis en medio sólido, utilizando una monocapa de células 143B infectada con el producto de la transfección sobre la cual se añadió una mezcla de agar noble (Difco) al 0,4% en DMEM con 2% de suero fetal bovino inactivado por calor y 5 bromo -2' deoxiuridina (BUDR, Serva) a 125 µg/ml. Posteriormente, sobre este se añadió una capa de agar noble (Difco) al 0,8% con rojo neutro (Flow Laboratories) al 0,02%.

Preparación del ADN para la hibridación

Se realizó a partir de multiplicar diferentes clones virales en placas de 24 pozos, hasta el 90% de células infectadas, momento en el cual fue recogido el contenido del pozo y se centrifugó en tubos Eppendorf a 12 500 rpm por cinco minutos. Retuvimos el pellet con 20 µl de sobrenadante, se congeló y descongeló tres veces para romper las células y se aplicó sobre un papel de nitrocelulosa (S&S), sobre el cual se realizó la hibridación con el ADN marcado.

Inoculación de animales

Los ratones utilizados fueron machos Balbc de 6 semanas, inyectados por vía intraperitoneal con dosis de 10^5 a $5 \cdot 10^8$ UFP. Los conejos (del tipo semigigante español) fueron inoculados con dosis de 10^7 y 10^8 UFP de virus

recombinante y 10^8 del tipo salvaje por vía intradérmica (tres sitios); las extracciones en ambos casos fueron realizadas aproximadamente cada 15 días.

Las determinaciones de producción de HBSAg en cultivo y de anticuerpos anti HBSAg en animales, fueron realizadas con un RIA comercial (CIS, Francia).

Preparación del ADN marcado

Doscientos nanogramos del ADN correspondiente al fragmento de 800 pb del HBSAg, fueron incubados a 37°C por tres minutos en presencia de 5 U de Klenow. Inmediatamente se le añadieron $1\ \mu\text{l}$ de 10 mM dCTP, dGTP, dTTP y $30\ \mu\text{l}$ de ^{32}P dATP (Amersham, UK). La reacción se incubó por 10 minutos adicionales a 37°C y se detuvo la reacción añadiendo solución detenedora (0,1 M NaCl; 0,5% SDS, 0,025 M EDTA) y calentando a 70°C por 15 minutos. Posteriormente se precipitó con etanol. La actividad específica de las sondas lograda con este método fue siempre superior a 10^8 cpm/mg de ADN.

Northern blot

El ARN del virus recombinante y tipo salvaje, fue obtenido según se describe. Se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 1% y formaldehído y se transfirió a nitrocelulosa. Se hibridizó con 106 cpm de sonda de HBSAg descrita previamente, en 50% de formamida, 6X SSC, 5X Denhart, $100\ \mu\text{g/ml}$ de t-ARN de levadura por 12 horas a 42°C . Se lavó en 2X SSC, 0,1% SDS, dos veces por 15 minutos, a temperatura ambiente; después en 0,2X SSC, 0,1% SDS, en las mismas condiciones que el lavado anterior; 0,2X SSC, 0,1% SDS por 30 minutos a 42°C ; el último lavado se realizó a 65°C y finalmente se autorradiografió.

Southern blot

Tres microgramos de los ADN aislados se digirieron con enzima de restricción Hind III y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 0,6%. Se transfirió posteriormente a un papel de nitrocelulosa. La hibridación se realizó con la banda de HBSAg descrita previamente, en iguales condiciones que las descritas para el *Northern*.

RESULTADOS Y DISCUSION

El plasmidio PREB fue producto de la unión del plasmidio PRE digerido con enzima de restricción Eco RI y el gen S del virus de la hepatitis tipo B de 800 pb (figura 2), el cual posee

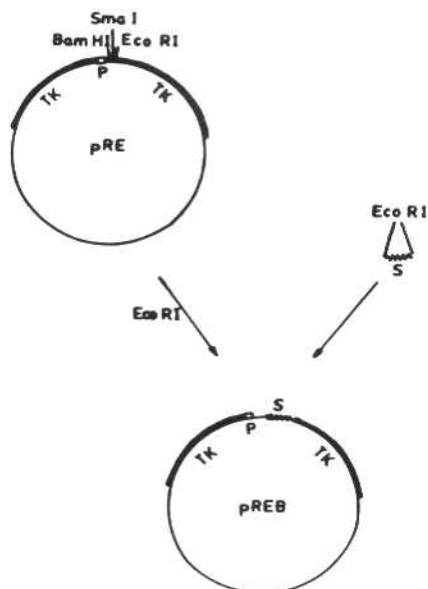


FIG. 2. Preparación del plásmido recombinante PREB

35 pb hasta el inicio de la traducción. Fue necesario aislar clones y hacer la determinación de la orientación con respecto al promotor 7,5 K, para lo cual se utilizó la enzima de restricción Hind II. Previamente, Smith *et al.* realizaron un clonaje similar, pero insertaron un fragmento correspondiente al HBSAg de 1 350 pb y en el cual existían 120 pb hasta llegar al inicio de la transcripción del gen S (Smith *et al.*, 1983a). Nosotros consideramos que este acercamiento al inicio de la transcripción de nuestro fragmento S puede redundar en una expresión más eficiente de dicho antígeno.

El plasmidio PREB1 que contiene el gen S correctamente orientado con respecto al promotor, fue utilizado para la transfección junto al virus *Vaccinia* fenotipo salvaje TK+. El resultado de esta transfección fue titulado en presencia o no de BUDR, observándose una frecuencia de aparición de virus con fenotipo TK- entre $5 \cdot 10^{-2}$ y 10^{-3} . Este resultado se obtuvo con concentraciones de 125 $\mu\text{g/ml}$ de BUDR, no correspondiendo con la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ reportada previamente (Mackett *et al.*, 1982) la cual, en nuestro caso, no fue selectiva.

Como es conocido, existe un por ciento de estos virus TK- que son producto de eventos espontáneos (Mackett *et al.*, 1982) y para establecer diferencia entre uno y otros, realizamos una hibridación con la banda utilizada en la clonación, marcada con ^{32}P α dATP. Varios de estos virus que dieron positivos para la presencia del gen, fueron multiplicados en placas de 24 pozos y el medio analizado por RIA para detectar la producción de antígeno de superficie, observándose que aquellos clones de virus TK- que habían hibridado con la banda del HBSAg, expresaban el antígeno de superficie, y no aquellos que eran TK- y que no hibridaron con dicha banda; de igual forma se comportó el tipo salvaje TK+ (tabla 1).

Tabla 1
DETERMINACION POR RIA DE LA EXPRESION DE ANTIGENO DE SUPERFICIE
POR CELULAS DE CULTIVO 143B CON DIFERENTES CLONES VIRALES

Muestra	Lectura (cpm)
1	12 525
2	10 970
3	11 850
4	10 816
5	12 056
6	12
7	20
8	6
9	3 655

Las muestras del 1 al 6 corresponden a virus *Vaccinia* TK-. Las muestras del 1 al 5 correspondieron a positivos en la hibridación con la banda del HBSAg y la 6 a una negativa, la 7 es el virus *Vaccinia* TK+ fenotipo salvaje y que resultó negativa en la misma hibridación, 8 y 9 son los controles negativo y positivo del sistema.

De estos clones de virus recombinantes fue seleccionado para el trabajo posterior el clon número 1, el cual se denominó VVHB1.

Se obtuvieron purificados virales para el aislamiento del ADN y su análisis posterior por restricción con enzima Hind III, donde se observó un aumento de talla en la banda J de 5 Kb, que es la que posee al gen TK y en cuyo interior se debía incorporar la banda del HBSAg aumentando su talla hasta 5,8 Kb (figura 3a). Se realizó un *Southern* en el cual se hibridizó

con la banda J de 5 Kb del ADN del virus *Vaccinia* digerido con enzima de restricción Hind III y con la banda Eco RI de 800 pb del HBSAg. En ambos casos se observó hibridación en la zona de 5,8 Kb coincidiendo con los resultados del análisis de restricción (figura 3b).

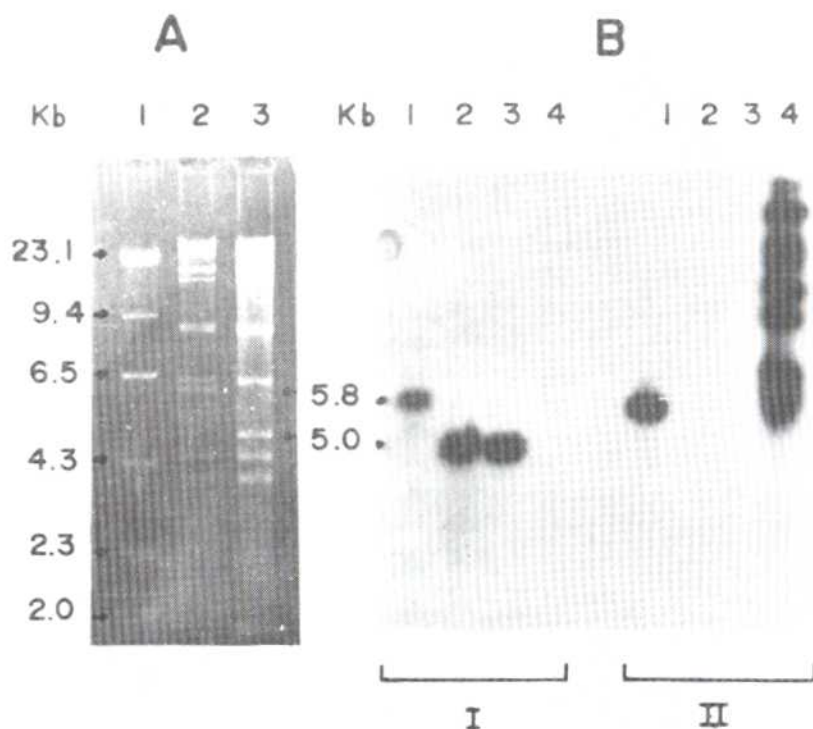


FIG. 3. a) Electroforesis en gel de agarosa (0,6%) del ADN del virus recombinante VVHB1 (línea 2) y del ADN del virus tipo salvaje (línea 3), ambos digeridos con enzima de restricción Hind III; b) Se muestran los resultados de la hibridación del material transferido a la nitrocelulosa. La sección I fue hibridada con la banda J de 5 Kb, observándose fijación de banda marcada en las 5,8 Kb del virus recombinante VVHB1 (línea 1) y en las 5 Kb del virus tipo salvaje (línea 2), el control positivo consistió en esta misma banda de 5 Kb (línea 3) y el control negativo fue un plasmidio que poseía la información del gen S (línea 4). En la sección II se corrieron los mismos ADN, pero se hibridó con la banda de 800 pb del gen S, ocurriendo apareamiento en las 5,8 Kb del virus recombinante y con el control positivo. Las tallas fueron determinadas por el ADN del fago λ digerido con endonucleasa Hind III.

A las células inoculadas con los clones virales se les extrajo el ARN para realizar un *Northern blot*, pudiéndose observar una banda que hibridó específicamente con la sonda del HBSAg al nivel de las 1 200 pb, correspondiendo con la talla del transcripto esperado. Se determinó que se habían obtenido 80 transcritos de HBSAg por células (figura 4), lo que equivaldría a ocho copias por genoma viral. Datos similares no han sido reportados, por lo que resultó imposible realizar algún tipo de análisis comparativo.

Con estas evidencias procedimos a inocular ratones y conejos con el clon viral VVHB1; en los últimos se observó un aumento gradual en los niveles de anticuerpos específicos contra el HBSAg los días 10, 22 y 35. En el caso del conejo inoculado con virus tipo salvaje, los anticuerpos anti HBSAg no fueron detectados en ninguna de las extracciones. Cincuenta días después de la inoculación, se observó una disminución en los niveles de anticuerpos de los conejos. Resultados similares fueron obtenidos en ratones.

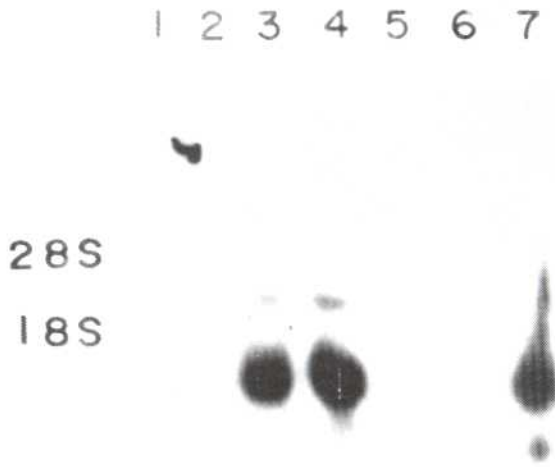


FIG. 4. Radiografía del Northern hibridado con banda Eco RI (800 pb) del HBSAg donde 1-ARN celular (20 μ g); 2-ARN virus *Vaccinia* tipo salvaje (20 μ g); 3-ARN virus *Vaccinia* recombinante clon VVHB1 (15 μ g); 4-ARN virus *Vaccinia* recombinante clon VVHB1 (20 μ g); 5-ADN del fago λ digerido con enzima Hind III; 6-Banda Eco RI del HBSAg (0,1 ng); 7-Banda Eco RI del HBSAg (1 ng).

Este experimento se encuentra actualmente en la fase de inoculación de chimpancés (tabla2).

Tabla 2
DETERMINACION POR RIA DE LA EXPRESION DE ANTICUERPOS ANTI HBSAg
EN EL TIEMPO EN CONEJOS VACUNADOS

Días después de la inoculación	Conejo 1 ($1 \cdot 10^7$ ufp) virus recombinante (cpm)	Conejo 2 ($1 \cdot 10^8$ ufp) virus recombinante (cpm)	Conejo 3 ($1 \cdot 10^8$ ufp) virus tipo salvaje (cpm)
0	139	139	158
10	540	1 342	162
22	1 527	4 165	125
35	4 294	12 678	134
50	2 318	10 135	143

AGRADECIMIENTOS

Queremos expresar nuestro más sincero agradecimiento a los licenciados Guillermo Padrón y Eliana Pérez, por la realización de las determinaciones por RIA; al médico

veterinario Teddy Verdecia, y a los técnicos Bárbara Rojas y Arturo Alfaro por la ayuda prestada en la realización de los esquemas de inmunización y en el cuidado y manipulación de los animales, y a los compañeros Aymeé Pérez, Luciano Hernández, Angel Aguilera, Eduardo Pentón y Gustavo Sierra, por su contribución en los aspectos teóricos.

REFERENCIAS

- ANDREWES, C. y H. G. PEREIRA (1967). *Viruses of Vertebrates*. London, Inglaterra, pp. 320-365.
- BULLER, R.; G. L. SMITH; K. CREMER; A. L. NOTKINS y B. MOSS (1985). *Decreased virulence of recombinant Vaccinia virus expression vectors is associated with a thymidine kinase-negative phenotype*. *Nature* 317: 813-815.
- DENNIS, E. H. y L. A. BALL (1981). *Cell-Free Synthesis of Enzymatically Active Vaccinia Virus Thymidine Kinase*. *Virology* 113: 594-601.
- JOKLIK, W. K. (1980). *Principles of Animal Virology*. New York, USA, pp. 228-235.
- KAUFMAN, R. J.; L. C. WASLEY; A. J. SPILJOTES; S. D. GOSSELS; S. A. LATT; G. R. LARSEN y R. M. KAY (1985). *Coamplification and Coexpression of Human Tissue-Type Plasminogen Activator and Murine Dihydrofolate Reductase Sequences in Chinese Hamster Ovary Cells*. *Molecular and Cellular Biology* 5: 1750-1759.
- KIENY, M. P.; R. LATHE; R. DRILLIEN; D. SPEHNER; S. SKORY; D. SCHMITT; T. WIKTOR; H. KOPROWSKI y J. P. LECOCQ (1984). *Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus*. *Nature* 312: 163-166.
- MACKETT, M.; G. L. SMITH y B. MOSS (1982). *Vaccinia virus: A selectable eukariotic cloning and expression vector*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 7415-7419.
- MACKETT, M.; T. YILMA; J. K. ROSE y B. MOSS (1984). *Vaccinia Virus Recombinants: Expression of VSV genes and protective immunization of mice and cattle*. *J. Virol.* 49: 433-435.
- MOSS, B. (1974). *Comprehensive Virology*. Heinz Fraenkel-Conrat and Robert R. Wagner, USA 3: 405-474.
- PANICALI, P.; S. W. DAVIS; R. L. WEINBERG y E. POALETTI (1983). *Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses. Biological activity of recombinant vaccinia virus expressing the influenza virus hemagglutinin*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5364-5368.
- PAOLETTI, E.; B. R. LIPINSKAS; C. SANSONOFF; S. MERCER y D. PANICALI (1984). *Construction of live vaccines using genetically engineered poxviruses: biological activity of vaccinia virus recombinants expressing the Hepatitis B virus surface antigen and the herpes simplex virus glycoprotein D*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 193-197.
- SMITH, G. L.; M. MARKET y B. MOSS (1983a). *Infectious Vaccinia Virus Recombinants that express Hepatitis B virus surface antigen*. *Nature* 302: 490-495.
- SMITH, G. L. y B. MOSS (1983b). *Infectious poxvirus vectors have capacity for at least 25 000 base pairs of foreign DNA*. *Gene* 25: 21-28.
- SMITH, G. L.; B. R. MURPHY y B. MOSS (1983c). *Construction and characterization of an infectious Vaccinia Virus recombinant that expresses the influenza virus hemagglutinin gene and that induces resistance to influenza virus infection in hamsters*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 7155-7159.
- SMITH, G. L.; G. N. GODSON; V. NUSSENZWEIG; R. NUSSENZWEIG; J. BARNWELL y B. MOSS (1984). *Plasmodium knowlesi sporozoite antigen expression by an infection Vaccinia virus recombinant*. *Science* 224: 197-199.
- SUNDARAJAN, V. y B. MOSS (1981). *In vitro transcription of the inverted terminal repetition of the Vaccinia virus genome: Correspondence of initiation and cap sites*. *J. Virol.* 37: 738-747.
- WIKTOR, T. J.; R. I. MARFARLAN; K. J. REAGAN; B. DIETZSCHOLD; P. J. CURTIS; W. H. WUNNER; M. P. KIENY; R. LATHE; J. P. LECOCQ; M. MACKETT; B. MOSS y H. KOPROWSKI (1984). *Protection from rabies by a Vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7194-7198.