

DISEÑO Y CONSTRUCCIÓN DE UN VECTOR PARA LA EXPRESIÓN DE EPITOPOS DE LA PORINA OMP_C, EN EL EXTREMO AMINO TERMINAL DE LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DEL CÓLERA

Secundino VI,¹ Paniagua-Solis J,¹ Isibasi A¹ y Sánchez J²

¹Unidad de Investigación Médica en Inmunoquímica, Hospital de Especialidades, Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS, México DF. ²Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Introducción

Cabe destacar la importancia de las porinas de *Salmonella typhi*, en la inducción de protección contra la fiebre tifoidea en el modelo murino; entre ellas OmpC, es capaz de inducir una protección del 30 % al reto con 100 DL₅₀ de la bacteria homóloga (1).

Sin embargo, aún no se conocen los epitopos responsables de esta protección. Se propuso un modelo topológico de OmpC, basándose en algoritmos de predicción. Este modelo esta constituido por 8 asas expuestas, 16 segmentos transmembranales y 8 regiones hacia el espacio periplásmico. En base al mismo, se expresaron las regiones 246-255 y 290-303 de OmpC, en el extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina del cólera (CTB). Estas regiones correspondían a las asas extracelulares parciales 6 y 7, respectivamente. Esta estrategia permitió comprobar que estos epitopos propuestos como regiones extracelulares se encuentran expuestos hacia el exterior de *S. typhi* (2, 3); sin embargo, el rastreo de los clones que contenían las proteínas de fusión asas: CTB fue difícil de efectuarse. Debido a lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue construir un vector que facilitara la expresión y el rastreo de las 8 regiones externas de la porina OmpC de *S. typhi* expresadas en el extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina del cólera.

Materiales y Métodos

Se utilizó como célula electrocompetente *Escherichia coli* DH10B; la transformación con los diferentes plásmidos se efectuó mediante electroporación. El vector plasmídico pJS752-3 (amp^r) contiene al gen de la subunidad B de la toxina del cólera (*ctb*), bajo control del promotor *tac*, posee los sitios de restricción Sac I y Xma I entre la unión que codifica para la secuencia líder y *ctb* (4, 5). Por ello, todos los oligonucleótidos que se inserten entre sitios se expresan como péptidos en el extremo amino terminal de CTB. Este vector se empleó para la construcción del plásmido pCTBtet (amp^r, tet^r): para ello se generaron los extremos Sac I (5') y Xma I (3') del gen de tetraciclina (*tc*) proveniente del vector pBR322, utilizando la técnica de mutagénesis. Posteriormente se subclonó el gen *tc* en el plásmido pJS752-3, construyéndose el vector pCTBtet (amp^r, tet^r), y se sacó de fase el gen *ctb*. Empleando este nuevo vector se construyeron los genes híbridos de las 8 asas de la porina OmpC, que correspondieron a la

asa 1 (aa 24-32), 2 (aa 02-73), 3 (aa 108-126), 4 (aa 152-175), 5 (aa 196-216), 6 (aa 246-261), 7 (aa 291-305) y 8 (aa 331-346); para ello sólo se seleccionaron las colonias tet^r, debido a que se intercambió la secuencia de *tc* por los oligonucleótidos que codificaban para cada una de las 8 asas de la porina OmpC; además entró nuevamente en fase *ctb*. Se detectó la secreción de las proteínas híbridas asas: CTB mediante la técnica de GMI-ELISA utilizando un anticuerpo monoclonal que reconoce únicamente la forma pentamérica de CTB.

Resultados y Discusión

Se mutagenizó el gen *tc* para que adquiriera los sitios de reconocimiento para las endonucleasas Sac I y Xma I, en los extremos 5' y 3', respectivamente; se obtuvo un producto de aproximadamente 1,3 Kpb y se subclonó en el plásmido pJS752-3. El vector resultante pCTBtet (amp^r, tet^r) presentó alrededor de 7060 pb y se comprobó la presencia de los sitios Sac I y Xma I; además se sacó de fase a *ctd* por ellos no se detectó la presencia de la proteína recombinante (CTB_r) en los sobrenadantes de cultivo. Este vector se empleó en la construcción de los 8 genes híbridos: pCTB-L1, pCTB-L2, pCTB-L3, pCTB-L4, pCTB-L5, pCTB-L6, pCTB-L7 y pCTB-L8, (la letra "L" seguida de un número indica la asa "loop" a la que pertenece). Se comprobó la presencia de los oligonucleótidos fusionados a *ctb*, mediante un mapa de restricción, cortando con las enzimas Bam I-II y Xma I, obteniendo diferentes fragmentos correspondientes a los genes de fusión. Posteriormente se determinó la presencia de las 8 proteínas quiméricas en los sobrenadantes de cultivo bacteriano, obteniendo aproximadamente de 160-200 ng proteínas de fusión/mL.

El empleo de la construcción desarrollada en el presente trabajo permitirá expresar y rastrear con rapidez los clones que contengan péptido de interés, en el extremo amino terminal de CTB. Las estrategias de rastreo pueden ser fenotípicamente (seleccionando los clones tet^r), utilizando un ensayo inmuno-enzimático (GMI-ELISA) y la comprobación de la presencia de los insertos mediante un mapa de restricción. En el trabajo actual, se expresaron de 9 a 24 aminoácidos sin que sufriera cambios la conformación estructural de CTB. Esto quedó demostrado debido a que en la técnica de GMI-ELISA, las proteínas de fusión se unen a su receptor (el gangliósido GM1, que es fijado en la placa de poliesti-

1. Isibasi A, Paniagua J, Rojo MP, Martín N, Ramírez G, González C et al. Role of porins from *Salmonella typhi* in the induction of protective immunity. *Ann NY Ac Sci* 1994;730:350-352.
2. Paniagua J, Sánchez J, Ortiz V, González C, Isibasi A. Construction of CTB fusion proteins for screening of monoclonal antibodies against *Salmonella typhi* Omp C peptide loops. *FEMS Microbiol Lett* 1996;141:31-36.
3. Paniagua J, Martín O, Ortiz V, Ramírez G, González C, Isibasi A. Predicted epitopes of *Salmonella typhi* Omp C porin are exposed on the bacterial surface. *Immunol & Infect Dis* 1995;5:244-249.
4. Sánchez J, Holmgren J. Recombinant system for overexpression of cholera toxin B-subunit as a basis for vaccine development. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:481-485.
5. Sánchez J, Johanson S, Lowenadler B, Snennerholm AM, Holgren J. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion protein for oral vaccination. *Res Microbiol* 1990;141:971-979.
6. Newton S, Klebba P, Michel V, Hofnung M, Charbit A. Topology of the membrane protein lamB by epitope tagging and a comparison with the x-ray model. *J Bacteriol* 1996;178(12):3447-3456.

leno) y posteriormente se agrega el anticuerpo LT39, que únicamente reconoce la forma pentamérica de CTB. Uno de los objetivos del presente trabajo es la caracterización del modelo topológico propuesto para OmpC, mediante la inserción de diferentes péptidos de esta porina en el extremo amino terminal de CTB, que permitan establecer si estos péptidos se encuentran en regiones transmembranales o en regiones expuestas al medio externo; una estrategia similar fue empleada para establecer el modelo topológico de LamB de *E. coli* (6). Por otra parte, también cabe destacar que el CTB es un excelente inmunoadyuvante, por ello radica la impor-

tancia a desarrollar un sistema que permita la expresión de péptidos unidos al CTB, por esto las fusiones genéticas ofrecen una buena alternativa en la obtención de altas cantidades de proteína. Finalmente, se tienen las siguientes conclusiones:

- Se construyó un vector que facilitó la fusión genética, expresión y rastreo de péptidos en el extremo amino terminal de la subunidad B de la toxina del cólera.
- Este vector (pCTBtet) se puede emplear para la expresión de cualquier otro péptido de interés biológico.

TOWARDS CLINICAL APPLICATION OF GAMMA INULIN ADJUVANTS

Peter D Cooper

Division of Immunology and Cell Biology, John Curtin School of Medical Research, Australian National University, Canberra, ACT, Australia 2600.

Introduction

Gamma inulin (γ -IN) adjuvants (1) depend on an unbranched polyfructose with a mol wt of 8000-12000 (50-75 residues). It is a chemically well-characterised neutral polysaccharide, cheap, easy to handle and purify and very stable. Unlike the α and β polymorphs, γ -IN is insoluble at 37 °C and controls its sole biological activity. It only activates complement of the alternative pathway, opsonising antigens with C3b fragments. These react with C3 receptors on leukocytes, activating them in turn. Thus the action of γ -IN is well understood, seeming to dissect out a non-toxic part of the inflammatory response. It is a potent immune modulator, having vaccine adjuvant, antitumour and natural immunity activity. Adjuvant action is much higher if γ -IN is co-crystallised with aluminium hydroxide ('Algamulin', AG): such particles both adsorb antigen and activate complement.

Progress towards human clinical application of γ -IN and AG as vaccine adjuvants has taken the following directions.

Results and Discussion

Standard vs fine formulations of AG

Published work with AG has used the 'standard formulation', with hydrated particle diameters $>2 \mu\text{m}$ and inulin: Al(OH)₃ ratios ~10:1. A commercially viable method now gives submicron particles ("fine formulation"). These diffuse faster from injection sites, are more active yet produce less local reaction.

High inulin: Al(OH)₃ ratio

Studies in C57 black mice (2) confirm that a high inulin: Al(OH)₃ ratio in AG greatly increases the emphasis on Th1 type antibodies (eg. IgG2a). The

inulin: Al(OH)₃ ratio can be manipulated to emphasise either Th1 or Th2 responses as desired. Most applications need the Th1, CMI emphasis (high inulin: Al(OH)₃ ratio $>30:1$).

Clinical Trials

A small Phase I human clinical trial of AG standard formulation (3) used a recombinant human papillomavirus (HPV) type 16 E7 protein. All patients seroconverted and the human efficacy of AG is supported. Toxicity at high doses (25 mg s.c.) was minimal.

Commercial antigens

Several clinical antigens are enhanced by AG. AG (fine formulation, high-Th1 emphasis) created specific CTL activity with HPV E7 protein in mice (4). Diphtheria toxoid antigenicity was boosted by AG (2), especially for IgG2a, and the life of antibody was extended. AG produced 5-6 times more primary antibody to hepatitis B virus surface antigen than equivalent doses of Al(OH)₃ (5). Gamma-irradiated or live whole influenza virus plus γ -IN induced protection against heterotypic influenza virus challenge (6). AG plus bromelain-extracted influenza virus haemagglutinin enhanced influenza viral clearance and neutralising anti-body in homotypic virus challenge (7). AG bearing conjugates of peptides of *Plasmodium falciparum* merozoite surface antigen 2 enhanced neutralising antibody and survival in mice challenged with *P. chabaudi* (8, 9).

Conclusion

The promise of γ -IN adjuvants for clinical use has increased.

1. Cooper PD. Vaccine adjuvants based on gamma inulin. *Pharmaceutical Biotechnology* 1995;6:559-580.

2. Gupta RK, Cooper PD 1996; In preparation.

3. Frazer IH, Tindle RW, Fernando G, Malcolm K, Herd K, McFadyen S, Cooper PD, Ward B. Safety and efficacy of an HPV16E7/Algamulin vaccine 1997; In preparation.

4. Fernando G Personal communication. 1995.

5. Cooper PD, Turner R, McGovern J. Algamulin (gamma inulin /alum hybrid adjuvant) has greater adjuvanticity than alum for hepatitis B surface antigen in mice. *Immunology Letters* 1991;27:131-134.

6. Cooper PD, Steele EJ. The adjuvanticity of gamma inulin. *Immunol Cell Biol* 1988;66:345-352.

7. Drummer HE, Tannock GA, Jackson DC. A comparison of the effects of different adjuvants on the immunogenicity of influenza virus and influenza virus haemagglutinin. 1997; In preparation.

8. Saul A, Lord R, Jones GL, Spencer L. Protective immunization with invariant peptides of the *Plasmodium falciparum* antigen MSA2. *J Immunol* 1992;148:208-211.

9. Jones GL, Spencer L, Lord R, Mollard R, Pye D, Saul A. Peptide vaccines derived from a malarial surface antigen: effects of dose and adjuvants on immunogenicity. *Immunology Letters* 1990;24:253-260.