

Diseño, construcción y evaluación de cuatro familias de vectores de ADN plasmídicos para transferencia génica en humanos

Antonieta M. Herrera Buch, Ernesto Galbán Rodríguez, Belkis Sandez Oquendo, Dagmara Pichardo Díaz, Alexis Musacchio Lasa, Orlando Hayes Rodríguez, Diógenes Quintana Vázquez, Dania M. Vázquez Blomquist, Yordanka Soria Hernández, Julio R. Fernández Massó, Carlos A. Duarte Cano, Carlos A. Román Collazo, Tays Hernández García, Pedro A. Valiente Flores

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP 6162, CP 10600, La Habana, Cuba
Telf.: 2716022, 271 6221 Ext. 7253; Fax: 271-4764, 271-8070, 33-6008
Email: antonieta.herrera@cigb.edu.cu

RESUMEN

La inmunización con ADN consiste en la administración *in vivo* de vectores de ADN plasmídico de expresión en mamíferos, codificantes para antígenos de interés vacunal. Es muy ventajoso para el país disponer de vectores propios, compactos y seguros para su administración en seres humanos, de acuerdo a las regulaciones establecidas internacionalmente. Este trabajo describe el diseño, construcción y evaluación de cuatro familias de vectores plasmídicos que cumplen con las características mencionadas. Constituyen aportes novedosos la evidencia por primera vez en Cuba de la expresión en músculo de ratón por inyección intramuscular de ADN codificante para genes reporteros; y la inducción de respuesta de anticuerpos específicos contra el antígeno por esta vía de inmunización; el establecimiento del método de purificación de ADN plasmídico empleando polietilenglicol 6000 y su aplicación a los esquemas de inmunización en ratones, y el primer reporte mundial del empleo del péptido señal de eritropoyetina humana para la expresión de proteínas heterólogas. Adicionalmente, se refiere la generación de respuesta de células T CD8+ secretoras de IFN- γ contra antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1. Estos vectores se emplean en investigaciones por varios grupos de tres instituciones cubanas, incluidos los ensayos de compasión con factor de crecimiento del endotelio vascular, y el desarrollo del candidato vacunal contra el virus de la hepatitis C. Los hallazgos presentados en esta propuesta a Premio de la ACC en el año 2003, constituyeron la base para el desarrollo de la transferencia genética en humanos empleando ADN plasmídico en nuestro país.

Descripción del resultado

Construcción de las series de vectores pAEC y pMAE

La estrategia en general consistió en el diseño y construcción de vectores plasmídicos que comprendieran en su unidad transcripcional los siguientes elementos: el promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, las secuencias de poliadenilación y procesamiento del ARNm del antígeno t del SV40 y un sitio múltiple de clonación que convirtiera a estas moléculas en vectores de fácil manipulación *in vitro*.

En cuanto a la unidad replicativa, estaría integrada por dos secuencias fundamentales: el origen de replicación para bacteria del pUC y el gen de resistencia a la kanamicina.

Para la construcción del primer vector, pAEC-K6, a partir del cual se generaron los restantes, se emplearon los plasmidios siguientes: pUC 19, pUC 4K (Amersham) y el pJAX.

El hecho de que a estos vectores se les haya incluido un sitio múltiple de clonación les confiere un atributo excepcional en este tipo de plasmidios para expresar genes de mamíferos, ya que contribuye de forma decisiva a minimizar el tiempo necesario para la clonación del antígeno y por tanto agiliza extraordinariamente el trabajo previo al comienzo de los ensayos en animales.

Las diferencias en las secuencias nucleotídicas de los vectores miembros de la serie pAEC justifican el hecho de que a cada uno de ellos le haya sido asignado un número de acceso diferente en la base de datos de secuencias de EMBL [1].

La familia pMAE constituye la segunda generación de la serie pAEC, siendo moléculas aún más compactas y, además, difiriendo de estas en que contienen la señal de poliadenilación de la β -globina de conejo y 5, 10 y 20 secuencias inmunoestimuladoras y se demostró su utilidad en la estimulación de la secreción de interferón tipo γ en experimentos de ELISPOT [2] (Figura 1).

Consideraciones sobre la aceptabilidad de las series pAEC y pMAE

Esta serie de vectores, diseñada y construida según las regulaciones dictadas por la Administración de Alimentos y Fármacos (AAF) y la OMS, cumple con los requisitos que ambas agencias reguladoras exigen en cuanto a los aspectos que se relacionan a continuación:

- Se dispone de la información de la construcción del plasmidio en su totalidad, con un mapa detallando las regiones relacionadas con las secuencias funcionales.
- Se conoce el uso específico de cada región de ADN y del marcador de selección.
- Se cuenta con el mapa de restricción.

Teniendo en cuenta además de estas características arriba mencionadas, las ya discutidas en el epígrafe anterior, donde se describe la construcción de esta serie de vectores, podemos afirmar que los mismos son moléculas compactas, seguras y fáciles de manipular *in vitro*.

1. Herrera AM, Rodríguez EG, Hernández T, Sández B, Duarte CA, (2000). A family of Compact Plasmid Vectors for DNA Immunization in Humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 279: 548-51.

2. Rodríguez EG, Vázquez DM, Herrera AM, Duarte CA, (2003). Enhanced cell mediated IFN- γ -secreting activity against the HIV-1_{gag} V3 peptide of the TAB9 multipeptide after DNA vaccine backbone engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308:713-8.

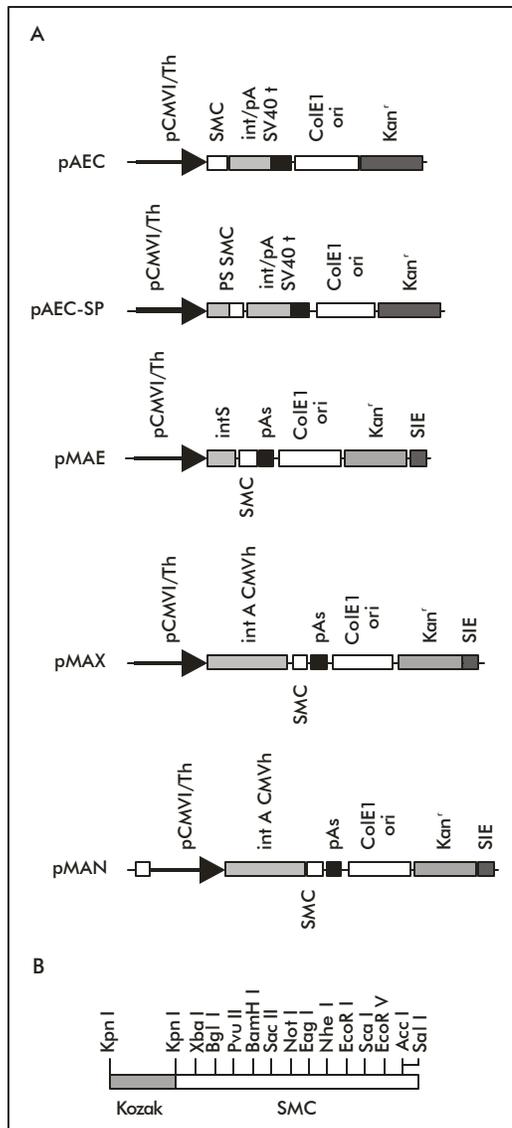


Figura 1. Esquema de los vectores de las series pAEC y pMAE para inmunización con ADN. A) Descripción de cada uno de los vectores y sus elementos, pCMV1/Th-promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano, SMC-sitio múltiple de clonación, int-intrón, pA terminador transcripcional y señal de poliadenilación, intS-intrón sintético, intA CMVH-intrón A de citomegalovirus humano, pAs-señal de poliadenilación sintética, Kan'-marcador de resistencia a kanamicina en bacterias, ColE1 ori-origen de replicación plasmídico derivado de pUC19, SIE-secuencia inmunostimuladora, SLN-secuencia de ADN de localización nuclear, SV40-virus de simios 40. B) Secuencia del sitio múltiple de clonación. Se muestran los nombres de los sitios correspondientes a las enzimas de restricción. Kozak-secuencia consenso de inicio de la traducción en eucariotes, de Kozak.

Por lo tanto, estas series de vectores ofrecen la ventaja que desde los inicios de un proyecto de investigación se trabaje con el plasmidio definitivo, evitando así pérdidas de tiempo y recursos en realizar la clonación del gen de interés varias veces. A los efectos de las pruebas de calidad esto también constituye una ventaja, ya que los datos que se obtienen desde los primeros experimentos en animales menores

son de la misma molécula que formaría parte de la formulación final.

Por todo lo anterior es que estas series de plasmidios son útiles potencialmente tanto en inmunización con ADN como en terapia génica.

Purificación de ADN plasmídico

Para estudios preliminares en el laboratorio empleando el modelo murino, tenemos el criterio de que es conveniente establecer una metodología única para contribuir a minimizar en lo posible las diferencias imputables al método de purificación empleado en los ensayos *in vivo*.

Si bien no es necesario que la metodología a elegir cumpla con lo establecido para uso clínico sí debe definirse el nivel de pureza que es posible alcanzar.

Se eligió el método de purificación basado en precipitación con polietilenglicol 6000 (PEG-6000) por dos razones fundamentales: en primer lugar por su sencillez y en segundo término porque nuestra experiencia previa nos indicaba que podíamos obtener preparaciones de la calidad que requeríamos.

Los parámetros que medimos rutinariamente para cada lote de plasmidio puro utilizando PEG-6000 son: integridad (por electroforesis en geles de agarosa), contaminación con proteínas (mediante la relación de los valores de densidad óptica (DO) a longitudes de onda de 260 y de 280 nm) y el por ciento de conformación super enrollada mediante el rastreo en ultravioleta del material aplicado a un gel de agarosa.

Como elemento adicional se realizaron experimentos de transfección *in vitro* empleando DEAE-Dextran, a cuatro lotes distintos del vector pCH110 para evaluar la calidad del plasmidio puro. Los resultados de estos experimentos arrojaron una eficiencia de transfección media del 27.46 %, con un valor de desviación estándar de 2.89.

Empleando PEG-6000 hemos obtenido resultados similares, en cuanto a los parámetros arriba discutidos, a los reportados en la literatura donde se han descrito los métodos de purificación por gradiente isopícnico de cloruro de cesio y cromatografía de intercambio aniónico con el objetivo de aplicarlos a la inmunización con ADN.

Es la primera vez que este método de purificación de plasmidios se reporta para ser empleado en experimentos de transfecciones *in vivo* [3].

Empleo del péptido señal de la eritropoyetina humana (EPOh) para la secreción de genes heterólogos

Se comparan tres construcciones que expresan gp120 del aislamiento MN del VIH-1 (gp120_{MN}): una que carece de péptido señal (pJAX-MN), otra donde el gen que codifica para la gp120_{MN} se encuentra fusionado a la secuencia de secreción del t-PA, (pJAXt-PAMN) y una tercera en la cual se sustituyó esta secuencia líder por la de la EPOh, (pJAX-EPOMN). Esta última construcción resultó ser más eficiente en la secreción al medio de la proteína.

Los resultados se obtuvieron mediante la transfección *in vitro* de las construcciones y evaluando mediante ensayos de ELISA los niveles de gp120_{MN}. Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia que demuestra la utilidad del empleo del péptido señal de la EPOh fusionado a proteínas heterólogas.

3. Herrera AM, López-Campistrous AE, Román CA, Sandez B, Hayes O, Hechavarria M, Duarte CA, (1997). Use of plasmid DNA purified by PEG precipitation for *in vitro* transfection in mice. *Minerva Biotecnologica* 9: 25-8.

Entre las estrategias que se están siguiendo por diferentes laboratorios en el mundo para el estudio y la optimización de esta nueva tecnología, ocupan, en nuestra opinión, un lugar relevante las que están dirigidas a potenciar la respuesta inmune y, nos ha resultado particularmente atractiva la relacionada con la modulación de la localización del antígeno, debido a los resultados que ya han sido reportados por diferentes grupos de investigadores. Estos elementos conjuntamente con nuestros resultados, conllevaron a que se considerara atractiva la idea de incluir en la serie de vectores pAEC para inmunización con ADN, un plásmido que contuviera la señal de secreción de la EPOh [4].

Expresión de β -galactosidasa (β -gal) en músculo de ratón

La elección de la β -gal como gen reportero nos permitió realizar la comprobación de su expresión en el tejido muscular inyectado con el plásmido pCH110 mediante un ensayo de tinción empleando como sustrato 5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D galactosidasa (X-gal). Los resultados obtenidos son congruentes con el número de dosis que se inyectaron, ya que después de la segunda inoculación el 51% de los músculos de los animales fueron positivos, mientras que las tinciones realizadas con posterioridad a la tercera inyección arrojaron que el 85% de los músculos analizados exhibían actividad de la enzima.

Estos resultados son similares a los reportados por otros autores que, empleando la luciferasa como gen reportero encontraron a los 4 días después de inyectar actividad enzimática en las células musculares de los ratones inyectados [3] (Figura 2).

Evaluación en el modelo murino de la capacidad inmunogénica de los vectores construidos

Esquema de inmunización en ratones usando el vector de expresión pCH 110

Con el objetivo de establecer la tecnología de inmunización con ADN se evaluó un primer esquema en ratones. En el mismo se siguieron los principios fundamentales que, hasta ese momento habían sido reportados en la literatura y se logró adaptarlos a nuestras condiciones de trabajo. Se inocularon dos grupos de ratones BALB/c de siete animales cada uno (suministrados por CENPALAB, La Habana, Cuba), dos o tres veces, respectivamente con un intervalo de 2 semanas. El grupo control fue inoculado con PBS. Se inyectaron 100 μ g de ADN, vía intramuscular en el cuádriceps en 0,1 mL de PBS, encontrándose los animales anestesiados con ketamina-diazepanotropina. Las extracciones se realizaron tres días después de la última inoculación. Después de esto los animales fueron sacrificados.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, es decir, no se detectó dependencia entre el por ciento de seroconversión y la dosis administrada. Esto se determinó aplicando la prueba exacta de Fisher sobre la tabla de contingencia 2x2.

Debido a que los niveles de anticuerpos detectados como resultado de los experimentos de ELISA fueron bajos, se impuso la necesidad de corroborar la especificidad de estos anticuerpos mediante un en-

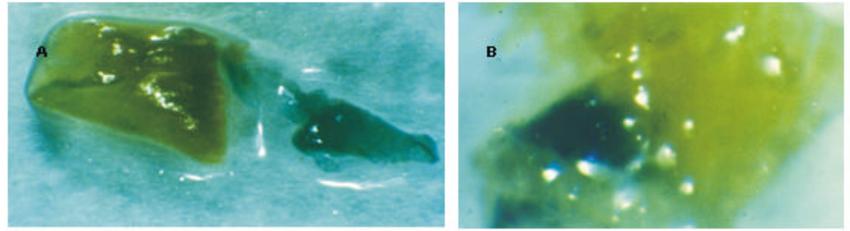


Figura 2. Las imágenes fueron tomadas con una magnificación 40X. Obsérvese que en todos los casos el tejido adiposo exhibe tinción inespecífica y fue separado del tejido muscular. A) Fotografía de la sección del músculo cuádriceps de un ratón perteneciente al grupo control negativo. B) Sección correspondiente al cuádriceps, después de la tinción empleando como sustrato X-gal, de un ratón que fue inyectado con el vector pCH110.

sayo de competencia empleando β -gal soluble, que confirmó una coincidencia entre los sueros positivos y más del 50% de inhibición. Este resultado permite afirmar que la seroconversión se debe a una respuesta específica contra el antígeno y no a un artefacto del ensayo de ELISA [3].

Inmunización de ratones con el vector de expresión pAEC-Mtab9.1

Este esquema se realizó con el objetivo de comprobar que el vector pAEC-Mtab9.1 era útil, para esto se emplearon tres grupos de ratones BALB/c de ocho animales cada uno (suministrados por CENPALAB, La Habana, Cuba), entre 8 y 10 semanas de edad. Un grupo experimental fue inoculado vía intramuscular (i.m), a otro grupo se le inyectó vía intraperitoneal (i.p) y el grupo control fue inyectado con el plásmido pAEC-M7 vía intramuscular. Las dosis de ADN administradas fueron las mismas empleadas en los esquemas descritos en los epígrafes 3.5 y 3.8, aunque en este caso los animales fueron inmunizados cuatro veces a intervalos de 4 semanas. Los niveles de anticuerpos obtenidos contra la proteína TAB-9, se evaluaron en las semanas 6, 10, 12 y 16, es decir, la última extracción se realizó 4 semanas después de la última dosis y los animales fueron sacrificados.

Se concluyó que se detecta un aumento significativo entre la semana 10 con respecto a la semana 6. El aumento entre las semanas 10 y 12 no resultó estadísticamente significativo. Sin embargo, la disminución de los títulos entre las semanas 12 y la semana 14 sí es estadísticamente significativa [1].

Inmunización de ratones empleando los vectores de expresión pMAXgagMIIB y pMANgagMIIB

Con vistas a evaluar la funcionalidad de las construcciones pMAXgagMIIB y pMANgagMIIB se estableció un esquema de inmunización en ratones Balb/C con inoculaciones en las semanas 0, 2, 4 administrando dosis de 100 mg de ADN.

Se realizó la evaluación de la respuesta secundaria de anticuerpos específica contra tiras recubiertas con proteínas antigénicas de VIH-1 del estuche comercial DAVIH-BLOT. Se encontró respuesta de anticuerpos específica contra Gag en la mezcla de los sueros extraídos de los grupos 3 y 4, 27 días después de haberse iniciado el esquema, correspondiente a los animales inoculados con los vectores

4. Herrera AM, Musacchio A, Fernandez JR, Duarte CA, (2000). Efficiency of Erythropoietin's Signal Peptide for HIV_{MN}-1 gp 120 Expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273: 557-9.

pMAXgagMIIIB y pMANgagMIIIB respectivamente. En los animales inmunizados correspondientes al grupo 3 se detectó respuesta contra la p24 mientras que en los del grupo 4 la respuesta detectada fue contra las proteínas p24 (proteína de la cápsida), p53, p55 (proteína precursora) y p68 (que tiene fragmentos de Gag unidos a Pol). Es significativo el hallazgo de respuesta de anticuerpos contra 4 proteínas después de solo dos dosis en el grupo 4. En los restantes grupos no se detectó respuesta de anticuerpos.

La generación de respuesta humoral en los grupos 3 y 4 contra la proteína Gag indica que se logró la expresión de ella independiente de la proteína reguladora Rev del VIH-1. El fenotipo asociado con la eliminación de secuencias inhibitorias, incrementa la estabilidad, transporte nucleocitoplasmático y transducibilidad del ARNm.

Evaluación de la respuesta celular secretora de IFN- γ restringida por presentación por MHC-I

La evaluación de la respuesta celular de secreción de IFN- γ en este estudio se realizó a partir de los esplenocitos obtenidos después de mezclar 3 bazos de ratones por cada grupo inmunizado, por ensayos de ELISPOT directo y después de la reestimulación por siete días de los esplenocitos obtenidos 39 días después de iniciado el esquema de inmunización. En la Figura 3 se muestran los resultados del ELISPOT realizado después de la reestimulación durante 7 días de los esplenocitos de los ratones inmunizados en los diferentes grupos donde se observa la respuesta de una población de células CD8⁺ enriquecidas en efectores de memoria. El análisis de los resultados muestra que entre los animales inmunizados con los plasmidios pMAXgagMIIIB y pMANgagMIIIB no hay diferencias apreciables.

Conclusiones

Se diseñaron y construyeron dos series de vectores, que cumplen con los requisitos exigidos para poder ser incluidos en una formulación vacunal aplicable a humanos. Estas familias de plasmidios tienen la característica de ser de fácil manipulación y, adicionalmente, permiten la clonación de diferentes tipos de antígenos, abarcando un amplio espectro de estrategias de clonación posibles. Uno de ellos, de la serie llamada

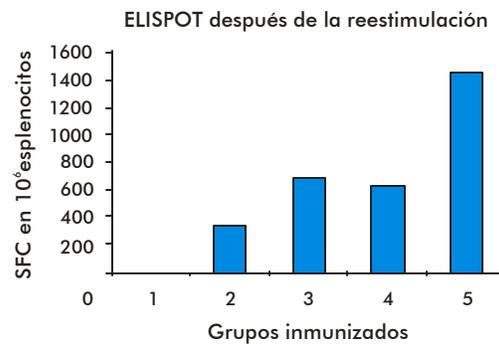


Figura 3. Respuesta secretora de IFN- γ mediada por presentación restringida al complejo de histocompatibilidad de tipo I, contra el péptido V3 del aislamiento IIB del virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1_{IIB}). Se presentan los niveles de células secretoras en 10⁶ células de bazo de ratones BALB/c, reestimuladas con dicho péptido, y evaluadas en presencia de células presentadoras P815. Los animales fueron inmunizados con los vectores vacunales pMAE5, pMAE-gagMIIIB (grupo 2), pMAX-gagMIIIB (grupo 3), pMAN-gagMIIIB (grupo 4) y pMAE-gagMIIIB+pCMVrev (grupo5). Las construcciones de los grupos 2 al 5, portan el gen de la proteína Gag del VIH-1 subtipo C, con la fusión carboxiterminal del péptido mencionado.

pAEC, contiene a la señal de secreción de la EPOh, que constituye un elemento original en el diseño de vectores de expresión. La familia pMAE constituye la segunda generación de la serie pAEC, siendo moléculas aún más compactas y, además, difiriendo de estos en que contienen la señal de poliadenilación de la β -globina de conejo y 5, 10 y 20 secuencias inmunoestimuladoras y se demostró su utilidad en la estimulación de la secreción de interferón tipo γ en experimentos de ELISPOT.

Se estableció un método de purificación de plasmidios por PEG 6000 con el cual, se obtienen preparaciones de plasmidios con las características requeridas para ser empleados en experimentos de inmunización de ADN en ratones.

Se demostró que estos vectores de expresión son funcionales como inmunógenos en el modelo murino y en el caso. Uno de estos vectores está siendo empleado en estudios preclínicos y de compasión para terapia génica con factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y otro de estos vectores fue empleado para la expresión del actual candidato vacunal contra el virus de la hepatitis C.