

Caracterización de proteínas presentes en proteoliposoma de *N. meningitidis*. Estudios de consistencia y reproducibilidad entre lotes de VA-MENGOC-BC® mediante técnicas proteómicas

✉ Lila Castellanos¹, Lázaro Betancourt¹, Gretel Sardiñas¹, Yasser Perera¹, Olivia Niebla¹, Darién García¹, Evelin Caballero¹, Karem Cobas¹, Sonia González¹, Gerardo Guillén¹, Lillian Uli², Ramón Barberá², Francisco Domínguez², Franklin Sotolongo²

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB Ave. 31 / 158 y 190 PO Box 6162, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

²Instituto Finlay Ave. 27 No. 19805 e/ 198 y 202, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

REPORTE

Introducción

La vacuna cubana VA-MENGOC-BC® contra la *Neisseria meningitidis*, producida por el Instituto Finlay, se obtiene de la cepa B:4:P1.19,15, contiene las vesículas de proteínas de membrana externa compuestas por cinco proteínas mayoritarias. Estos antígenos son los siguientes: Por A, Por B, Rmp M, Opa y Opc A. Además está presente el lipopolisacárido del serogrupo C [1-3].

En este trabajo se describe el análisis del proteoliposoma presente en la vacuna cubana VA-MENGOC-BC®, mediante técnicas de proteómica, y se demuestra la elevada reproducibilidad entre lotes de fabricación y la identificación de componentes proteicos minoritarios.

Como consecuencia de este estudio se conoció que las cinco proteínas mayoritarias con estructura molecular intacta representan entre el 58 y el 65% del contenido proteico. En esas especies el contenido es mucho mayor, pues se identificaron numerosos productos de degradación parcial en la preparación. Se identificaron 65 especies por espectrometría de masas (MS, siglas en inglés), en las que se observaron 31 proteínas; de ellas, 26 nuevas proteínas que son componentes minoritarios de la preparación. Fueron seleccionadas dos proteínas y se clonaron sus genes codificantes, los cuales se expresaron bajo control del promotor triptófano. Se evaluaron las proteínas correspondientes como inmunógenos en ratón, capaces de inducir una respuesta de alta calidad funcional.

Este trabajo confiere un muy alto grado de caracterización a la vacuna cubana a nivel molecular.

Materiales y métodos

Muestras estudiadas

Lotes de proteoliposoma: MPA 018B, C, D, F, aprobados por Control de Calidad para su liberación en el Instituto Finlay. El lote MPA 018B se empleó en la estandarización de la electroforesis bidimensional y se continuó usando como control en todos los ensayos.

Preparación de la muestra

Se estableció un procedimiento adecuado para remover los componentes lipídicos presentes, sin afectar

la composición proteica de la muestra. Este procedimiento se aplicó a los lotes en estudio.

Análisis por electroforesis bidimensional

El estudio de todos los lotes comprendió la separación de las proteínas en los siguientes rangos de puntos isoeléctricos de 3-10, 6-11 y 4-7, y masas entre 12 y 120 kDa. Los geles obtenidos se analizaron con un procesador profesional para imágenes de geles bidimensionales y se utilizaron las herramientas estadísticas de análisis de datos disponibles en el programa.

Identificación de proteínas presentes

Se efectuó mediante la digestión proteolítica con tripsina, seguida del análisis por espectrometría de masas. La identificación de proteínas se estableció mediante la ejecución de varios espectros de fragmentación (MS/MS) para cada proteína que suministraron regiones de secuencias internas. Esta información se utilizó para la identificación mediante búsqueda en bases internacionales de secuencias proteicas.

Clonaje, expresión y purificación de los genes codificantes para las proteínas NMB0088 y NMB2134 *N. meningitidis* en *Escherichia coli*

Para realizar el clonaje y la expresión de los genes codificantes para las proteínas NMB0088 y NMB2134, se utilizó el vector pM-100, y los oligonucleótidos 7742-7743 para el *nmb2134* y 7998-7999 para el *nmb0088*. Para la expresión de ambos genes, se transformó la cepa de *E. coli* GC 366 con los plasmidios correspondientes por el método químico. Ambas proteínas se obtuvieron en el precipitado de ruptura, lo que representa el 50% del total de las proteínas presentes en esta fracción. La proteína NMB2134 se obtuvo con 70% de pureza, en tanto la NMB0088 se obtuvo con 86%. Los experimentos de inmunización se realizaron en ratones hembras de 6 semanas de edad, cada grupo formado por diez animales. Cada animal/grupo recibió tres dosis de 20 mg cada una, adyuvada con alúmina. La calidad de la respuesta inmune fue medida por ELISA, medición de la actividad bactericida del suero, y protección inducida contra la bacteriemia en el modelo de rata infante y en el de ratón neonato.

1. Sierra GV, et al. Vaccine against group B *Neisseria meningitidis*: protection trial and mass vaccination results in Cuba. NIPH Ann Dis (1991); 14(2):195-210.

2. Rodríguez AP, et al. The epidemiological impact of antimeningococcal B vaccination in Cuba (1999). Mem Inst Oswaldo Cruz; 94(4):433-40.

3. Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Biset G, García LG, Puentes G, et al. Method of producing *Neisseria meningitidis* B vaccine, and vaccine produced by method. United States Patent number 5 597 572.

Resultados e importancia

Se encontraron condiciones que permitieron una excelente separación de los componentes de la vacuola cubana VA-MENGOC-BC[®], mediante 2 electroforesis bidimensional (DE) en tres rangos de punto isoeléctrico. Se estudia un material de referencia y tres lotes consecutivos de producción. La comparación de los mapas mediante herramientas estadísticas demostró la alta reproducibilidad entre los tres lotes consecutivos. Los coeficientes de correlación entre geles resultaron entre 0.954 y 0.997. El número de especies resueltas en rango de pI entre 3 y 10 unidades fue de 256 a 297, mientras que en el rango de pI de 4 a 7 (con mayor resolución) fue de 623 a 642. Los cinco componentes mayoritarios íntegros (sin considerar degradaciones) constituyen entre el 58 y el 65% del material separado por 2DE. Estos componentes se detectaron, además, en numerosas especies resueltas, de inferior valor de masa molecular. Se seleccionaron 78 especies para digestión, de ellas, 15 no dieron información útil y 63 especies fueron identificadas por espectrometría de masas. De las 63 determinaciones exitosas, se identificaron 29 proteínas (Figura 1 y Tabla 1). Los números de las anotaciones se corresponden con la numeración de las proteínas en la tabla. Se encontró una misma

proteína en varias bandas del gel bidimensional. Por ejemplo, la proteína de membrana externa de clase 3, se identificó en 13 manchas. También se observó este fenómeno en otras proteínas como el factor de elongación G, que a pesar de estar representado en el gel bidimensional por una mancha pequeña, no mayoritaria, se identificó en 4 bandas. Se detectó un grupo de bandas de geles bidimensionales pertenecientes a 5 proteínas, que contenían péptidos, cuyas masas estaban incrementadas en 80 unidades con respecto a los valores teóricos esperados, todo lo cual indicaba la presencia de alguna modificación en la secuencia de aminoácidos de estos péptidos (Tabla 1). Resulta interesante que las proteínas modificadas son proteínas de membranas, que pertenecen al grupo de las más abundantes presentes en el preparado vacuolar, y corresponden al grupo de proteínas de *N. meningitidis* que ha sido ampliamente estudiado en estudios inmunológicos. Dos de las proteínas identificadas se consideraron con potencial interés vacuolar. Los genes codificantes se clonaron y se expresaron para un estudio de reconocimiento inmunológico en modelos animales. Ambas proteínas indujeron títulos bactericidas detectables contra la cepa homóloga y tres cepas heterólogas, y protegieron a los animales contra dos cepas de *N.*

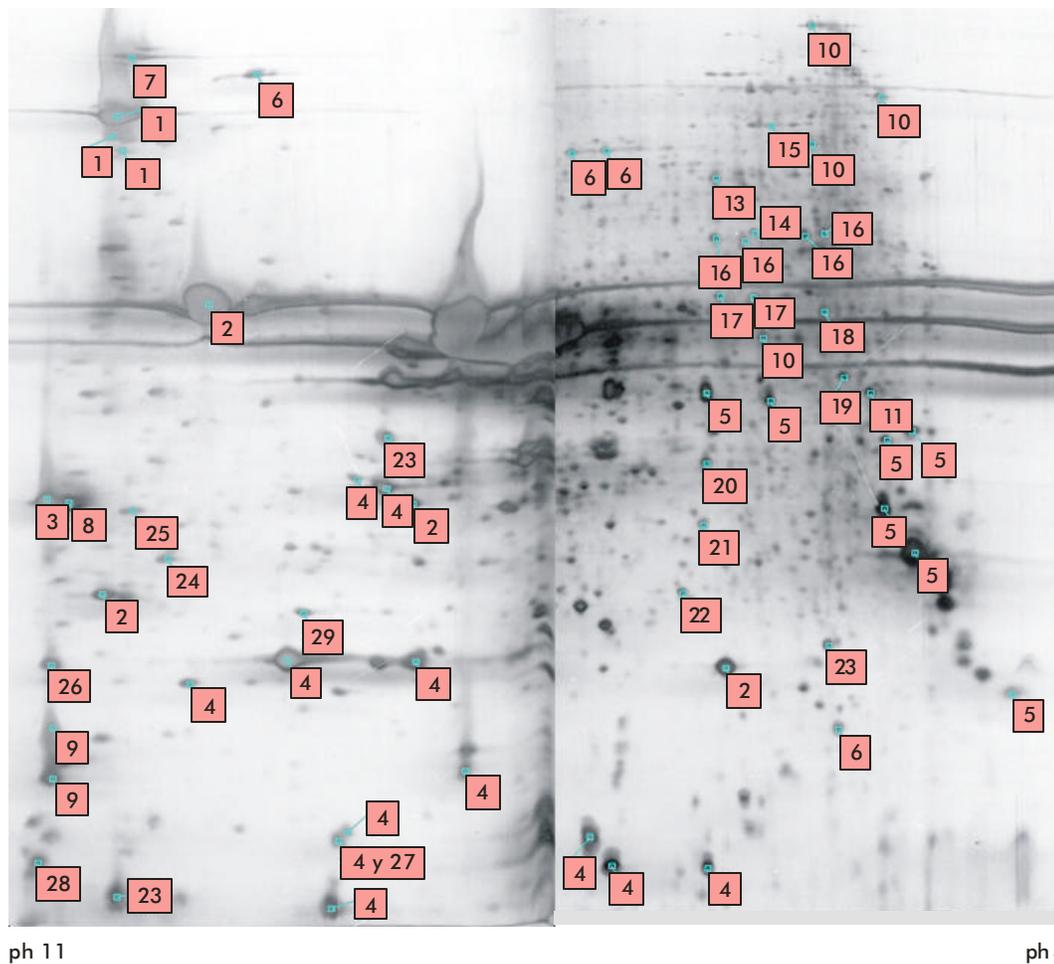


Figura 1. Imagen sintética de los geles preparativos utilizados para las identificaciones por espectrometría de masas. Todas las especies identificadas aparecen señaladas.

Tabla 1. Proteínas identificadas a partir de los geles bidimensionales

No.	Proteína/gen	Peso molecular teórico (kDa)/pI	Código Banda de gel	No. de acceso Swissprot	No. péptidos encontrados/ No. péptidos secuenciados	% de cobertura
1	OMP regulada por hierro (FrpB)	79/9.45	NMI-38	Q9JXL3	24/4	37
			NMIII-8	Q51132, Q50944, Q51162, Q9JXL3 ó Q9JWB8	2/2	3
			NMIII-10	Q51132, Q9JXL3 ó Q51133	2/2	5
2	OMP clase 1	41/8.73	NMI-115	Q9S3T9	13/4	34
			NMI-270	Q9XBN3	4/2	14
			NMIII-76	Q9R3P0	9/4	29
			NMIII-117	Q9JJP1	8/3	30
			NMII-769	Q9S3T9	9/3	36
3	OMP clase 5c	28/9.68	NMI-233	Q9AE79	10/2	51
			NMIII-72	Q9AE79	12/5	67
4	OMP clase 3	34/6.09	NMI-292	P30688	11/4	46
			NMII-847	Q51139	7/2	26
			NMII-863	O68155	6/1	34
			NMII-865	Q9R3T1	7/2	34
			NMIII-135	P30688	9/1	42
			NMIII-149	O53988	2/2	12
			NMIII-163	P30688	6/3	23
			NMIII-171	P30688	3/1	10
			NMIII-173	P30688	4/1	15
			NMIII-182	P30688	6/2	27
			NMIII-61	Q51139	7/3	37
			NMIII-67	P30688	12/4	55
			NMIII-137	P30688	9/1	42
5	OMP clase 4 (RMPP ó NMB0382)	26/6.00	NMII-414	P38367	9/2	61
			NMII-431	P38367	6/2	28
			NMII-470	P38367	5/1	41
			NMII-483	P38367	4/2	23
			NMII-587	P38367	6/1	39
			NMII-638	P38367	5/3	33
			NMII-779	P38367	4/1	31
6	OMP 85 (OMP85)	88/8.75	NMII-799	O30912 ó Q9K1H0	9/2	12
			NMIII-3	O30912 ó Q9K1H0	17/2	23
7	Receptor de hemoglobina (NMB1668)	89/9.35	NMIII-2	Q9JYA8	31/3	43
8	Proteína de opacidad (OPA)	27/9.45	NMIII-74	O30756	13/2	55
9	Proteína de superficie A NsgA (NSPA ó NMB0663)	18/9.64	NMIII-154	Q9RP17	3/3	24
			NMIII-164	Q9RP17	4/4	46
10	Factor de elongación G (FUSA ó NMB0138)	77/5.08	NMII-14	Q9K118	31/2	63
			NMII-56	Q9K118	26/2	50
			NMII-95	Q9K118	6/2	7
			NMII-340	Q9K118	10/2	20
11	Factor de elongación TU (TUFB)	43/5.07	NMII-421	Q9K117	3/3	11
12	Acetolactato sintetasa III, subunidad mayor (NMB1577)	63/5.88	NMII-99	Q9JY10	11/2	25
			NMII-101	Q9JY10	4/2	8
13	ATP sintetasa F1 subunidad alfa (NMB1936)	56/5.43	NMII-122	Q9JXQ0	11/2	23
14	Homoserina deshidrogenasa (HOM ó NMB1228)	47 / 5.31	NMII-188	Q9JR84	3/1	11
15	Aminopeptidasa propuesta (NMB1428)	65/5.31	NMII-86	Q9JYU4	3/3	6
16	3-oxoacil-(proteín transportadora de acilo) sintetasa II (NMB0219)	43/5.36	NMII-191	Q9K1D8	2/2	5
			NMII-192	Q9K1D8	9/1	45
			NMII-197	Q9K1D8	4/3	16
			NMII-198	Q9K1D8	1/1	5
17	Glicer aldehído 3- fosfato deshidrogenasa (NMB2159)	36/5.40	NMII-277	Q9JX95	2/2	6
			NMII-278	Q9JX95	8/2	32
18	Transaldolasa (TAL ó NMB0351)	38 / 5.09	NMII-301	Q9K139	12/3	47
19	Flavoproteína de transferencia de electrones, subunidad alfa (NMB2154)	33/4.99	NMII-401	Q9JXA0	6/1	39

Tabla 1. (Cont.)

No.	Proteína/gen	Peso molecular teórico (kDa)/pI	Código Banda de gel	No. de acceso <i>Swissprot</i>	No. péptidos encontrados/ No. péptidos secuenciados	% de cobertura
20	Tetrahidropiridina-2-carboxilato N-Succiniltransferasa (NMB0335)	30/5.42	NMII-518	Q9K152	8/3	30
21	Regulador de respuesta de unión a ADN (NMB0595)	25/5.44	NMII-613	Q9JRJ9	4/4	32
22	Oxidoreductasa propuesta (NMB1796)	21/5.73	NMII-705	Q9JY11 ó Q9JVV3	3/2	28
23	Cisteína sintetasa propuesta (CYSK ó NMB0763)	33/6.06	NMII-754 NMIII-48 NMIII-179	Q9JQL6 Q9JQL6 Q9JQL6	7/2 8/2 6/1	29 29 30
24	Proteína de intercambio tiol: disulfuro propuesta (NMB0550)	29/8.49	NMIII-104	Q9JR63	8/2	28
25	Proteína ribosomal 30S S2 (RPSB ó NMB2101)	27/9.04	NMIII-80	Q9JRG7	9/3	37
26	Ribosomal 50S L6 (NMB157)	19/9.63	NMIII-139	Q9K1I3	5/1	28
27	Ribosomal 50S L9 (RPLI ó NMB1320)	16/6.61	NMIII-173	Q9JZ31	8/2	59
28	Ribosomal 50S L11 (NMB0127)	15/9.72	NMIII-175	Q9K1J3	4/1	30
29	Ribosomal 50S L25 (NMB0876)	21/6.60	NMIII-124	Q9JZW3	11/1	51

meningitidis. La proteína NMB2134 resultó altamente inmunogénica en el modelo de ratón neonato, que mide la capacidad de montar una respuesta inmune efectiva en etapas tempranas. La respuesta funcional obtenida a partir de estos experimentos de inmunización a nivel de actividad bactericida y protección en modelos animales, condujo a la presentación de dos patentes.

Importancia del estudio

Cuando se realizó este trabajo (2001-2004), no existía ningún reporte científico sobre la caracterización de vacunas comerciales mediante técnicas de proteómica, y en particular mediante electroforesis bidimensional de alta resolución. Tampoco existía ningún reporte de utilización de esa potente herramienta analítica para el estudio de la consistencia entre lotes de producción. De hecho, esta aplicación requiere de una altísima reproducibilidad en el sistema de análisis, para garantizar que las diferencias se deban a cambios en el analito (la vacuna) y no a una pobre reproducibilidad del procedimiento (electroforesis bidimensional). La causa es la notoria dificultad para el análisis de proteínas de membrana con este sistema, que presenta la ventaja de detectar con gran sensibilidad ligeros cambios en la composición de las preparaciones proteicas, por tratarse de la herramienta más potente para la resolución de proteínas que existe (ello lo hace única entre las técnicas analíticas).

Por primera vez se evidenció la consistencia del proceso de producción la vacuna VA-MENGOC-BC[®], de alta complejidad en su composición proteica, a partir de los valores de abundancia de sus componentes principales, con la aplicación de una técnica novedosa de alta resolución, la electroforesis bidimensional y una plataforma de proteómica. Un aporte significativo al desarrollo de vacunas basadas en vesículas de membrana externa es la identificación de componentes que no estaban previamente descritos, como son la FrpB (FetA) y la proteína NspA; la identificación de una gran cantidad de componentes minoritarios y la estimación de su potencial contribución a la inducción de una respuesta inmune protectora. Estos componentes minoritarios se describen por primera vez en el mundo, en una vacuna basada en vesículas de membrana externa. La relevancia de este último reporte se manifiesta también en la identificación de dos candidatos vacunales contra *N. meningitidis*, serogrupo B. Se clonaron los genes correspondientes a estos dos candidatos, se purificaron las proteínas recombinantes resultantes, y se emplearon en evaluaciones de inmunogenicidad en ratones. Los resultados con estos candidatos vacunales en modelos animales llevaron a la presentación nacional de dos solicitudes de patentes.

Este trabajo confiere a la vacuna cubana VA-MENGOC-BC[®] un alto grado de caracterización a nivel molecular, y permitió identificar los componentes minoritarios que pueden estar también contribuyendo al efecto protector de la vacuna.