

Nuevas evidencias acerca de la cápsida del virus como candidato vacunal contra el virus Dengue 2 sin la inducción de anticuerpos neutralizantes

Carlos López¹, Laura Lazo¹, Lázaro Gil¹, Lisset Hermida¹, Gerardo Guillén¹, Guadalupe Guzmán², Susana Vázquez², Lídice Bernardo², Aída Zulueta¹, Jorge Martín¹, Iris Valdés¹, Jorge Sánchez¹, Aracelys Blanco¹, Yaremis Romero¹, Ivón Menéndez¹, María C de la Rosa¹, Gabriel Márquez¹, Ricardo Silva¹, Viviana Falcón¹, Manuel Selman-Housein¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB
Ave. 31 e/ 190 y 158, AP 6162, CP 10 600, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba

²Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"
E-mail: laura.lazo@cigb.edu.cu

Introducción

El dengue es la enfermedad viral transmitida por artrópodos más ampliamente difundida que afecta a la población humana. El agente causal de esta enfermedad es el virus dengue (VD), perteneciente al género *Flavivirus*, familia *Flaviviridae*, que se transmite por la picada del mosquito *Aedes aegypti* [1].

Muchas estrategias están actualmente en investigación para desarrollar una vacuna efectiva y segura contra el dengue, aunque hasta la fecha ninguna por sí sola ha demostrado ser completamente efectiva. Los candidatos vacunales más avanzados en el mundo están constituidos por cepas atenuadas del virus, las cuales tienen como limitantes la posibilidad de reversión a la virulencia y la reactividad detectada en humanos [2]. Teniendo en cuenta estas desventajas, la variante de una formulación basada en proteínas recombinantes constituye una estrategia atractiva para el desarrollo de un candidato vacunal. La proteína de la envoltura constituye la diana principal de la respuesta inmune hospedera, capaz de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes. Sin embargo, los candidatos vacunales basados en esta proteína conllevan el riesgo potencial de inducir el fenómeno de amplificación dependiente de anticuerpos (ADA) si no se logra una respuesta neutralizante efectiva contra los cuatro serotipos [3]. Existen trabajos recientes que apuntan a una correlación entre la generación de una respuesta celular citotóxica y la protección frente al reto viral en diferentes modelos animales [4]. Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se propuso desarrollar la proteína de la cápsida como candidato vacunal contra el citado virus, la cual no es capaz de inducir anticuerpos antivirales y por tanto, se elimina de este modo el riesgo de inducir ADA.

Resultados

El presente trabajo constituye el primer estudio sobre el clonaje y la expresión en *Escherichia coli* de la proteína recombinante de la cápsida del VD2. Como resultado de la expresión, la proteína se obtuvo con un peso molecular de 15 kDa, y constituyó el 15% del total de las proteínas celulares. Posteriormente la proteína fue semipurificada hasta el 60% de pureza mediante cromatografía de intercambio iónico y caracterizada mediante cromatografía de filtración en gel en la que se detectaron agregados de alto peso molecular.

Con la preparación semipurificada y agregada se realizó un esquema de inmunización en ratones Balb/c para evaluar la capacidad inmunogénica y protectora de la proteína recombinante. Como resultado de este primer esquema se obtuvo el 44% de protección en ratones tras la inoculación intracraneal con VD2 y sin detección de anticuerpos neutralizantes [5]. Similares porcentajes de protección en ratones se han correlacionado con una respuesta protectora total en el modelo de monos.

A partir del resultado obtenido se desarrolló un proceso de purificación, el cual permitió obtener la proteína con más del 90% de pureza. A causa de la naturaleza dimerica de la proteína pura, se estandarizó un proceso de obtención de partículas *in vitro*. Se mostró mediante microscopía electrónica que la obtención de partículas de la proteína dependía de la neutralización de las cargas positivas de los dímeros y se obtuvo partículas semejantes a virus de 25 nm de diámetro (Figura 1). El diámetro de las partículas obtenidas *in vitro* concuerda con el diámetro de la nucleocápsida viral nativa.

Con la nueva preparación pura y las partículas se realizó una nueva evaluación inmunológica en ratones,

1. Gubler DJ, Kuno G. Viral pathogenesis of dengue infections. In: Gubler DJ, Kuno G, editors. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CAB International 1997:273-5.

2. Tolou H, Pisano MR, Deubel V. Problems et perspectives en matière de vaccination contre les flavivirus. *Bull Inst Pasteur* 1992;90:11-29.

3. Halstead SB, O'Rourke EJ. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med* 1977;146:201-29.

4. Van Der Most RG, Murali-Krishna K., Ahmed R, Strauss JH. Chimeric yellow fever/dengue virus as a candidate dengue vaccine: quantitation of the dengue virus-specific CD8 T-cell response. *J Virol* 2000;74:8094-101.

5. Lazo L, Hermida L, Zulueta A, Sánchez J, López C, Silva R, Guillén G, Guzmán MG. A recombinant capsid protein from Dengue-2 induces protection in mice against homologous virus. *Vaccine* 2007;25:1064-70.

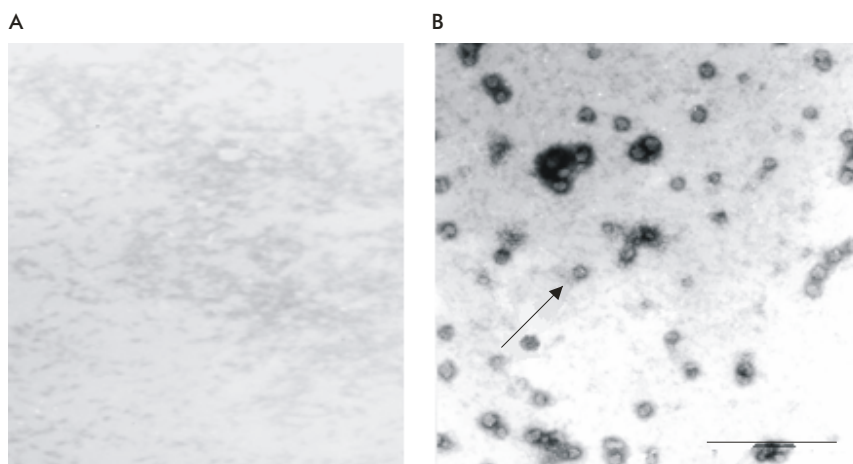


Figura 1. Análisis por microscopía electrónica de tinción negativa. La barra equivale a 200 nm.

A. Cápsida dimerica desalada en tampón de partículas.

B. Cápsida dimerica desalada en tampón de partículas, después de incubada con oligonucleótidos (la flecha señala una partícula tipo).

en la cual se evidenció que el proceso de purificación y de obtención de partículas no afectó la inmunogenicidad de la proteína recombinante. Además, se apreció un aumento en la protección con el antígeno en partículas respecto a la proteína dimérica.

Para caracterizar la respuesta inmune inducida en los ratones, se realizó un estudio de eliminación selectiva de células T CD8⁺ en ratones inmunizados, antes de la inoculación con el virus. Estos experimentos permitieron definir que la protección conferida por esta proteína no está mediada por células T CD8⁺, ya que no hubo afectación estadísticamente significativa en el porcentaje de ratones protegidos entre los grupos de ratones con la eliminación de esta población celular y sin ella.

Por último, se evaluó la capacidad inmunopotenciadora de la proteína de la cápsida sobre otros antígenos. Para ello se realizaron esquemas de inmunización en los que se coimmunizó la proteína quimérica PD-24 con la proteína de la cápsida del VD2 obtenida de forma recombinante, pura y en partículas obtenidas *in vitro*. La proteína PD-24 es una proteína de fusión entre la proteína P64K de *Neisseria meningitidis* y el dominio III de la proteína de la envoltura del VD4. Se pudo constatar que los porcentajes de protección (Figura 2), así como los niveles de anticuerpos antivirales inducidos por la proteína quimérica fueron mayores cuando los ratones se inmunizaron con preparaciones que contenían la cápsida.

La presente investigación mostró, por primera vez, que puede existir protección contra el VD sin la inducción de anticuerpos antivirales con el empleo del antígeno de la cápsida como candidato vacunal. De esta forma se evidenció la importancia de la respuesta celular en la protección contra el virus. Igualmente, se reporta por primera vez la obtención *in vitro* de partículas de la proteína de la cápsida del VD y se muestra que su ensamblaje es dependiente de la neutralización de las cargas positivas de los dímeros.

Adicionalmente, se estandarizó un proceso de obtención de partículas *in vitro* con ácidos nucleicos de secuencias "no definidas", que permitió obtener partículas semejantes a virus de diámetro similar a los reportados para la cápsida nativa. Se demostró que es posible obtener partículas semejantes a virus con la utilización de polímeros biodegradables que neutralicen las cargas positivas de la cápsida, lo que es de gran importancia en el desarrollo de formulaciones vacunales, pues se eliminan los riesgos del uso de ácidos nucleicos en ellas. Estos experimentos muestran a la vez, que deben existir mecanismos de regulación en la morfogénesis viral que permiten la unión de la cápsida al ARN viral, los cuales aún no han sido descritos.

Los resultados que evidencian la protección inducida por la proteína de la cápsida fueron publicados [5] y están protegidos por una solicitud internacional de patente que también protege el empleo de la cápsida como inmunopotenciador en formulaciones vacunales [6].

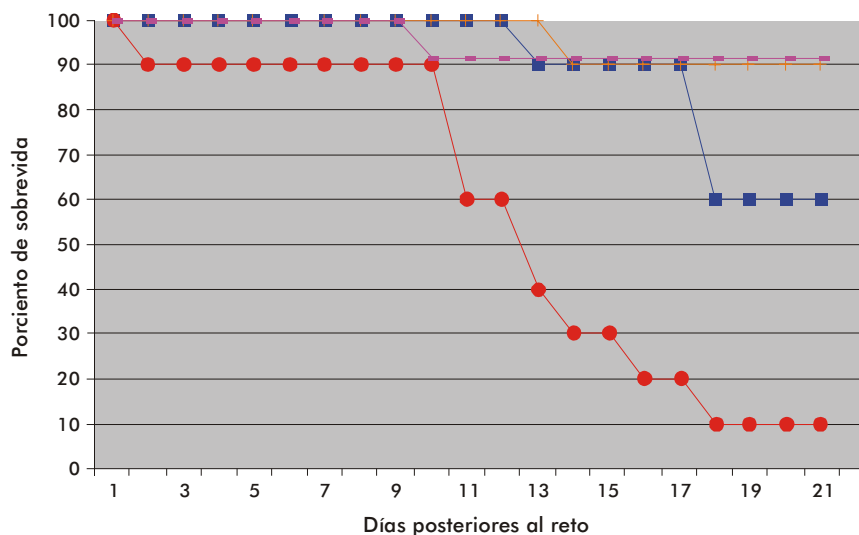


Figura 2. Protección ante la inoculación con 100 veces la dosis letal media (100 DL50) de VD4 después de la inmunización con: PD-24 adyuvada en alúmina (■); PD-24 y cápsida de VD2 adyuvada en alúmina (▲); control negativo (●); virus Dengue 4 (+).

Relevancia del estudio

La fiebre del dengue y la fiebre hemorrágica del dengue adquieren cada vez mayor importancia como problemas de salud, entre 50 y 100 millones de casos de la primera y de 250 000 a 500 000 de su variante hemorrágica son reportados cada año en el mundo. En Cuba han ocurrido 4 epidemias bien definidas, entre las cuales se destacan la del 1981 y 1997. Teniendo en cuenta que no existe protección cruzada entre los 4 serotipos virales, nuestra población es susceptible de ser afectada por dicha enfermedad. A pesar de los numerosos esfuerzos que se realizan para eliminar el agente transmisor, contar con una vacuna efectiva sería una solución total, de gran impacto social y económico. Actualmente no existe una vacuna disponible en el mercado y los candidatos más avanzados en el mundo se corresponden con cepas atenuadas del virus. Teniendo en cuenta su posibilidad de reversión así como la reactogenicidad ya demostrada en humanos, la variante de una formulación basada en proteínas recombinantes constituye una alternativa interesante. Dentro de esta variante, contar con un candidato vacunal que evite el riesgo de la immunoamplificación dependiente de anticuerpos es de suma importancia, pues este fenómeno es el principal contribuyente de la fiebre hemorrágica del VD.

Reconocimientos

Los autores agradecen la colaboración de *Glaxo China*, por su contribución con el análisis de la estructura bidimensional de la proteína de la cápsida para la definición de las variantes experimentales, y a la técnica *Yadira Rodríguez* por su colaboración en la manipulación y cuidado de los animales inmunizados.

6. Lazo L, Hermida L, Lopez C, Valdes I, Sierra B, Vázquez S, Guillen G, Guzman MG, Zulueta A, inventors. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, assignee. The capsid protein of Dengue virus inducer of a protective immune response and pharmaceutical composition. WO/2007/031034. 2006 Sept 18.