

DESARROLLO DE VACUNAS ORALES BASADAS EN PROTEÍNAS RECOMBINANTES DERIVADAS DE LA TOXINA DEL CÓLERA

JOAQUÍN SÁNCHEZ, BIOL., M. EN C., PH. D.,⁽¹⁾ ROSA MARÍA SOLÓRZANO, L.T.A..⁽¹⁾

Sánchez J, Solórzano RM.
Desarrollo de vacunas orales basadas en
proteínas recombinantes derivadas de la
toxina del cólera.
Salud Publica Mex 1992;34:287-291.

RESUMEN

En este artículo se presenta un enfoque novedoso para la creación de antígenos por ingeniería genética mediante el uso de las subunidades constituyentes de la toxina de V. cholerae como acarreadores de epitopes heterólogos. En particular en este trabajo se detallan algunas manipulaciones de las subunidades A y B de la toxina de cólera, que por un lado facilitan la inserción de epitopes a la subunidad B y que por otro permitirán el uso de la subunidad A en la construcción de antígenos recombinantes semejantes a aquéllos derivados de la subunidad B.

Palabras clave: vacunas, cólera, proteínas recombinantes

Sánchez J, Solórzano RM.
Development of oral vaccines based on
recombinant proteins derived from
cholera toxin.
Salud Publica Mex 1992;34:287-291.

ABSTRACT

In this paper a new approach to create antigens through genetic engineering is discussed. In this particular case the subunits of V. cholerae toxin are used as heterologous epitope carriers. In this paper the manipulation of A and B subunits is described. This manipulation allows both the insertion of epitopes to the B subunit and the use of subunit A in the construction of recombinant antigens similar to the ones derived from subunit B.

Key words: vaccines, cholera, recombinant proteins

Solicitud de sobretiros. Dr. Joaquín Sánchez, Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad 655, Col. Sta. María Ahuacatlán, 62508 Cuernavaca, Morelos, México.

LA GRAN MAYORÍA de las enfermedades infecciosas tienen lugar o empiezan en las superficies mucosas: la mucosa gastrointestinal, la mucosa respiratoria o la urogenital. El mecanismo de defensa inmune

contra estas infecciones depende principalmente, si no exclusivamente, de los sistemas de inmunidad local situados por debajo de dichas superficies. Este tejido, llamado tejido linfoide asociado a mucosas (MALT en inglés) cons-

(1) Centro de Investigaciones sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, Morelos, México.

Fecha de recibido: 8 de enero de 1992 Fecha de aprobado: 24 de febrero de 1992

tituye alrededor del 75 por ciento del sistema inmune total del organismo. Este MALT es, sin embargo, difícil de estimular por medio de vacunas inyectables. La inmunización oral, por el contrario, es muy superior a la inmunización parenteral en lo que se refiere a provocar la producción de la inmunoglobulina IgA para proteger contra infecciones que se inician en estas mucosas.

Uno de los mejores inmunógenos orales capaces de estimular una respuesta a nivel de mucosa es la toxina elaborada por *V. cholerae*. Esta toxina está formada por dos tipos de subunidades, una llamada subunidad B (de aquí en adelante denominada CTB) y otra llamada subunidad A (CTA). Se ha demostrado que es principalmente la subunidad B la que es muy eficaz para estimular inmunidad en las mucosas tanto intestinal como de otros órganos. Esta propiedad parece ser igualmente conservada aun cuando se añada a CTB haptenos heterólogos por ingeniería genética.

Nuestro enfoque para desarrollar vacunas derivadas de la toxina del cólera consiste precisamente en hacer uso de CTB y CTA como acarreador de epitopes foráneos. Las proteínas híbridas así construidas serán utilizadas para despertar una respuesta inmune contra estos epitopes a través de la estimulación de la mucosa intestinal.

FUSIONES GENÉTICAS A LA SUBUNIDAD B DE LA TOXINA DE CÓLERA

Para obtener proteínas híbridas derivadas de CTB hacemos uso de las técnicas de ingeniería genética que permiten adicionar segmentos de DNA, generalmente sintéticos, que permiten insertar en la misma fase de lectura traduccional de CTB, péptidos de hasta 20-25 aminoácidos en el extremo amino o carboxilo de la proteína.

La concepción de tal estrategia surgió al tiempo que creábamos plásmidos capaces de expresar cantidades aumentadas de CTB para preparar una vacuna contra el cólera.¹ En ese estudio, al clonar el gene CTB bajo el promotor tacP, abrimos simultáneamente la posibilidad de emplear esta proteína como un acarreador general de antígenos para vacunas orales.^{2,3}

FUSIONES GENÉTICAS A LA SUBUNIDAD A DE LA TOXINA DE CÓLERA

Durante el proceso de intoxicación por la toxina del cólera, CTB se une al receptor GM1 en la superficie de la célula y permite que la otra parte de la toxina, la subunidad

A, interactúe muy de cerca con la membrana y penetre al citoplasma, afectando al sistema de la adenilato-ciclasa causando un incremento en los niveles de cAMP intracelular, evento considerado clave en el intestino para la pérdida de fluidos típica del cólera. Nosotros planeamos explorar si podemos tomar ventaja de las propiedades de la interacción con la célula de la subunidad A para fusionar antígenos a una proteína modificada no-tóxica e investigar si esta forma de presentación de antígenos puede ser tan o más eficaz que la presentación usando el componente CTB de la toxina del cólera. Sin embargo, en fusiones genéticas iniciales^{4,5} encontramos que la subunidad A (en nuestro caso su homólogo por excelencia, la subunidad A de *E. coli* enterotoxigénica, LTA) retenía su actividad tóxica, lo cual nos llevó a dejar de lado estas proteínas de fusión y preferir CTB. Más recientemente, se ha demostrado que la alteración de ciertos aminoácidos en la subunidad A (LTA y por extensión CTA) reducen drásticamente su capacidad tóxica. Por ello, nos proponemos ahora retomar los experimentos de fusión genética a la subunidad A suprimiendo primero los residuos 6-9 de esa subunidad para eliminar su toxicidad. Al mismo tiempo, introduciremos sitios de restricción necesarios para la fusión de epitopes (figura 4), quedando lista la subunidad A modificada (presumiblemente no tóxica) para crear proteínas de fusión con epitopes (agregados a su extremo amino) de manera análoga a las fusiones a CTB.

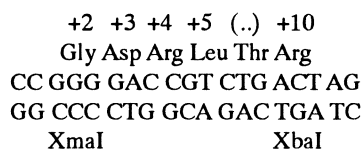


FIGURA 1. Secuencia sintética de los oligonucleotidos usados para suprimir los residuos 6 a 9 del extremo amino de la subunidad A

Secuencia nucleotídica del extremo amino de la subunidad A madura con delección de los residuos 6 a 9. El extremo amino del gene que codifica la subunidad A se modificará usando las secuencias sintéticas mostradas en la figura. Nótese que en estas manipulaciones se incorpora un sitio XmaI. Este sitio está en fase con aquél en el gene CTB, con lo cual la subunidad A se podrá subclonar después del péptido líder de CTB y será transcrita por el

promotor que precede a este último gene. Esto permitirá además realizar fusiones genéticas en esta posición de los mismos epitopes fusionados a CTB y dará proteínas híbridas análogas a aquellas derivadas de CTB, permitiendo la comparación de sus propiedades antigénicas e inmunogénicas, pues las proteínas solo diferirán en la proteína acarreadora.

Las proteínas híbridas finales se expresarán en una bacteria que producirá simultáneamente CTB, para formar un complejo igual al de la toxina nativa pero que no tendrá la toxicidad asociada con la subunidad A.

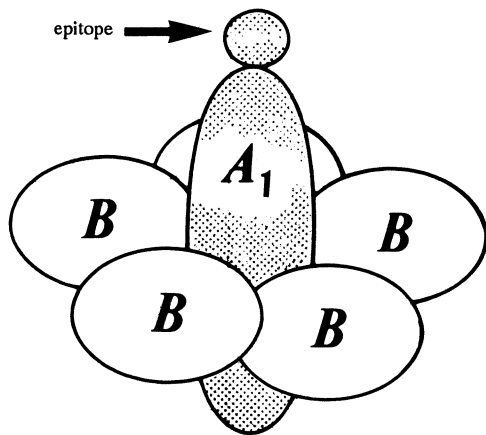


FIGURA 2. Representación esquemática de la molécula final derivada de las subunidades recombinantes A y B donde la subunidad A porta el epítipo agregado. Se indican la subunidad B y la región A1 de la subunidad A. La unión del epítipo toma lugar en el extremo amino de esta última región.

En la actualidad llevamos a cabo experimentos para mejorar el uso de ambos CTB y la subunidad A para acarrear antígenos heterólogos.

Creemos que esta línea de investigación tiene un gran futuro, sobre todo porque podría permitir a nuestro país llevar a cabo la producción de vacunas a gran escala usando tecnología poco costosa y sin gran sofisticación.

Así, planeamos obtener vacunas recombinantes contra organismos tales como *E. coli* enterotoxigénica (generando inmunidad contra sus enterotoxinas), rotavirus (inmunidad contra las proteínas de superficie), el agente causal de la tosferina (inmunidad contra la subunidad S1 de la

toxina pertúsica) y tal vez contra el agente causal del SIDA (inmunidad contra la proteína GP120 que forma parte del virus HIV).

Mediante la comparación de proteínas híbridas derivadas de CTB y de la subunidad A no-tóxica, determinaremos cuál de las dos proteínas acarreadoras es capaz de presentar de la mejor manera los epitopes fusionados para lograr una respuesta inmune fuerte que permita proteger contra el factor de virulencia o patógenos relevantes.

Para poder comparar las propiedades inmunogénicas de las proteínas híbridas derivadas de CTB y de la subunidad A, proponemos fusionar a ellas los mismos epitopes. Tenemos ya experiencia con epitopes relacionados a la enterotoxina STa de *E. coli* e inicialmente obtendremos derivados con un decapeptido no tóxico que reacciona con anticuerpos anti-STa. Inicialmente se llevarán a cabo inmunizaciones parenterales en conejos para probar los antiseros obtenidos en el ensayo del ratón lactante a fin de determinar su capacidad de neutralizar los efectos de la toxina STa. Posteriormente, se llevarán a cabo inmunizaciones orales en ratones para determinar la antigenicidad de las proteínas híbridas cuando éstas se suministran por vía oral.

Con los datos obtenidos en estos estudios, se evaluará la posibilidad de iniciar estudios de inmunogenicidad en humanos. Se planea detectar la presencia de anticuerpos secretores tipo IgA dirigidos contra la enterotoxina termoestable en las heces de estos voluntarios.

Las manipulaciones programadas comprenden modificaciones a los vectores con el gene CTB para facilitar la tarea de monitoreo de colonias que producen las proteínas híbridas. Esto será de gran utilidad cuando se quieran crear proteínas híbridas que lleven epitopes para los que aún no se cuente con anticuerpos específicos o bien para cuando se desee evitar el riesgo de usar ciertos anticuerpos, como en el caso de epitopes del virus HIV para los que se prefiere no usar sueros de individuos HIV-positivos.

Para este fin, construiremos vectores en los que el gene para CTB esté inicialmente fuera de fase (traducción no exitosa). Sólo cuando se haya logrado la fusión genética de interés la fase de traducción de CTB será reconstituida (figura 2). La fase de traducción correcta (de la que se infiere la presencia de la proteína de fusión deseada) podría entonces ser monitorizada fácilmente usando anticuerpos anti-CTB (monoclonales). Este procedimiento nos ha dado ya muy buenos resultados en un sistema análogo que usa un gene para otra toxina (toxina termoestable) (Datos no publicados). La detección de colonias recombi-

nantes con este enfoque tiene mayor certeza pues se tienen que distinguir colonias CTB-positivas de entre un fondo de colonias CTB-negativas.

```

SacI           SacI           XmaI
Gly Ala Pro Ala Ser Thr Ser
GGA GCT CCG GCG AGC TCT ACT AGT CCC GGG
CCT CGA GGC CGC TOG AGA TGA TCA GGG CCC
    
```

FIGURA 3. Región del gene en la que se realizan las inserciones de DNA con extremos compatibles a SacI y XmaI

Estrategia para poner fuera de fase al gene CTB en el punto de inserción de epitopes. En la figura 3 se muestra la región del gene en la que se realizan las inserciones de DNA con extremos compatibles a SacI y XmaI. En esta figura se muestra el gene en fase. Si se digiere con SacI y se religa a manera de eliminar el segmento entre los dos sitios de restricción, se obtiene una fase de lectura incorrecta. El vector con esta modificación permitirá continuar con la inserción de oligos SacI-XmaI mediante el restablecimiento de la fase correcta que resulta en la expresión de CTB.

Construcción de un gene sintético para fusiones a CTB. Es nuestro interés también determinar si en CTB existen sitios internos que permitan la inserción de epitopes y que presenten esas regiones antigénicas de una mejor forma al sistema inmune de las mucosas. Para ello crearemos un gene CTB sintético formado mediante la unión de oligonucleótidos de doble cadena. Estos oligonucleótidos, preparados *ad hoc*, introducirán sitios de restricción a lo largo del gene. Los cinco "cassettes" a emplearse tienen sitios de restricción complementarios. Como se ve en la figura 4, el gene CTB sintético final tendría varios sitios de restricción únicos colocados a lo largo del gene. Estos sitios de restricción serán empleados para insertar los epitopes de interés. El estudio de las proteínas híbridas resultantes determinará si existen sitios "permisivos" dentro de CTB.

```

EcoRI SacISacIXmaI   NcoI XbaI  SpeI  HindIII
!_____!!_____!_____!_____!_____!_____!
    
```

FIGURA 4. Gene CTB sintético final

Representación esquemática del gene CTB sintético. La presencia de diferentes sitios de restricción a lo largo del gene se indica. Estos sitios se emplearán para insertar epitopes de interés. Los dos sitios SacI contiguos son para alterar la fase de traducción de CTB y generar los vectores que se describen en el pie de la figura 3 y en el texto.

El plan de experimentación comprende también el tratar de aumentar al máximo los niveles de traducción de las proteínas recombinantes. Para este fin nos proponemos colocar secuencias de DNA que aumenten la eficiencia de traducción de las proteínas. Usando oligonucleótidos sintéticos introduciremos una secuencia de unión a ribosoma consenso (llamada S/D) y al mismo tiempo modificaremos la distancia entre esta secuencia y el codón de iniciación (Met). La secuencia del segundo codón será cambiada a la secuencia GCT que se ha informado puede influir positivamente en la traducción (figura 1). Estas manipulaciones respetarán los sitios de restricción (SacI y XmaI) que serán empleados para fusionar epitopes (véase mas adelante).

```

          S/D           Met   ***
T GGAGG  AAAAAATT  ATG  GCT——
A CCTCC  TTTTAA   TAC  CGA——
    
```

FIGURA 5. Señal de unión al ribosoma GGAGG, el primer residuo en la proteína (Met) y el segundo codón introducido

Secuencia del extremo 5' de los genes CTB y LTA que incorporará señales para mejorar la traducción. En la figura 5 se indican la señal de unión a ribosoma GGAGG (S/D), el primer residuo en la proteína (Met) y con asteriscos el segundo codón introducido.

RESULTADOS

Al momento actual hemos introducido al gene para la subunidad A (LTA) un adaptador en el sitio XbaI que cambia a este sitio por XmaI y elimina los residuos 6-9 tal como se discute más arriba (figura 4). Estamos ahora introduciendo un adaptador en el extremo carboxilo a nivel del residuo 236 que introducirá sitios XbaI y HindIII (Sánchez, Argotte y Solórzano, datos no publicados) para subsecuentemente subclonar la subunidad A mutante en otro vector para ser co-expresada con CTB y obtener una

enterotoxina presumiblemente no tóxica tal como la que se presenta en la figura 2.

Una vez concluidos estos experimentos, procederemos a insertar en el extremo amino de LTA (en la unión entre el péptido líder y la secuencia madura) epitopes relacionados a la enterotoxina termoestable STa de manera análoga a lo notificado para CTB.²

Las manipulaciones del extremo amino de CTB así como la substitución del gene nativo por uno sintético con múltiples sitios de restricción están en progreso. Sin embargo, los primeros vectores ya generados con un enfoque semejante permiten anticipar que al menos el perturbar y reconstituir la fase de lectura funcionará adecuadamente.

REFERENCIAS

1. Sánchez J, Holmgren J. A recombinant system for overexpression of cholera toxin B-subunit in *Vibrio cholerae* as a basis for vaccine development. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:481-485.
2. Sánchez J, Svennerholm AM, Holmgren J. Genetic fusion a non-toxic heat-stable enterotoxin related decapeptide antigen to cholera toxin B-subunit. FEBS Lett 1988;241:110-114.
3. Sánchez J, Johansson S, Lowenadler B, Svennerholm AM, Holmgren J. Recombinant cholera toxin B subunit and gene fusion proteins for oral vaccination. Res Microbiol 1990;141:971-979.
4. Sánchez J, Uhlin BE, Grundstrom T, Holmgren J, Hirst TR. Immunoactive chimeric ST-LT enterotoxins of *Escherichia coli* generated by in vitro gene fusion. FEBS Lett 1986;208:194-198.
5. Sánchez J, Hirst TR, Uhlin BF. Hybrid enterotoxin LTA: STa proteins and their protection from degradation by in vivo association with B-subunits of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. GENE 1988;64:265-275.