

'Las Partículas Semejantes a Nucleocápsidas: una estrategia vacunal alternativa y segura contra los virus del dengue, basada solo en la generación de respuesta inmune celular

Unidad Ejecutora Principal del Resultado: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP. 6162, Ciudad Habana, Cuba. Telf. 2716022 fax: 2714764.

Institución colaboradora: Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri"

Autores principales: Lázaro Gil (CIGB 9%), Laura Lazo (CIGB 9%), Karem Cobas (CIGB 9%), Lisset Hermida (CIGB 9%), Edith Suzarte (CIGB 6%), Ernesto Marcos (CIGB 6%), Alienys Izquierdo (IPK 6%), Iris Valdés (CIGB 6%), Gerardo Guillén (CIGB 5%), María G. Guzmán (IPK 5%), Laura Hernández (CIGB, 5%).

Otros autores: Pedro Puentes (CIGB, 4%), José A. Silva (CIGB 4%), Aracelys Blanco (CIGB 4%), Yaremis Romero (CIGB, 2%), Viviana Falcón (CIGB 2%), Aina Méndez (IPK, 2%), Yusleidi Pérez (CIGB 1%), Jorge Castro (CIGB, 1%), Melyssa Yaugel (CIGB, 1%), Mariela Vázquez (CIGB 1%), Sonia González (CIGB 1%), Mayling Álvarez (IPK 1%), Rosa Ramírez (IPK 1%)

Número de colaboradores: 17

Antecedentes: A pesar de los esfuerzos dedicados a dilucidar los mecanismos vinculados a la protección y la inmunopatogénesis asociada a la infección con Dengue, aun no existe un correlato de protección definido que facilite el desarrollo de una vacuna eficaz y segura contra este patógeno. Recientemente, la compañía Sanofi-Pasteur registró la vacuna Dengvaxia[®], pero esta no ha sido aprobada para niños menores de nueve años de edad, por cuestiones de seguridad e ineficacia protectora (incremento del número de hospitalizaciones). Además hoy se conoce, que los anticuerpos neutralizantes, considerados como premisa clave para la protección, pueden también ser amplificadores de la infección viral cuando no tienen una alta afinidad y concentración. Por otro lado, evidencias experimentales en ratones, monos y humanos sobre la falta de correlación entre la respuesta neutralizante y la protección, sugieren que otros componentes del sistema inmune pueden desempeñar un papel en el control de la infección. En la actualidad el papel protector de la respuesta inmune celular se ha caracterizado con mayor profundidad y varios estudios señalan la seguridad de esta respuesta, capaz de evitar el desarrollo de la forma severa de la enfermedad incluso en condiciones de amplificación de la infección viral mediada por anticuerpos (ADA). De hecho, una posible explicación para la ausencia de protección en individuos vacunados con Dengvaxia[®] es la ausencia de epítopos de células T específicos a Dengue en la vacuna.

Problema a resolver: En la búsqueda de un candidato vacunal que genere solamente una inmunidad mediada por células contra el virus, el grupo cubano para el desarrollo de una vacuna se focalizó en la proteína de cápsida (C), por ser esta el principal blanco de la respuesta de células T CD4⁺ y también generar una respuesta de células T CD8⁺ durante la infección natural. Además, los anticuerpos anti-C no reconocen al virus, por ser este un virus envuelto; de ahí que nunca estarán involucrados en el fenómeno de ADA. **Resultados:** De esta forma se obtuvo por vía recombinante la proteína C del serotipo 2 y se observó que la misma formó partículas semejantes a nucleocápsidas (PSN), al ser incubada con oligodesoxinucleótidos (ODN). Estas PSN-2 indujeron una respuesta inmune celular funcional y protectora en ratones BALB/c, sin la contribución de la respuesta inmune humoral. Basado en estas evidencias, se obtuvieron las proteínas correspondientes a los restantes serotipos, las cuales formaron PSN al ser incubadas con un ODN de probada capacidad inmunoestimuladora. La evaluación inmunológica en ratones BALB/c de las formulaciones monovalentes y tetravalente de las PSN, demostró que independientemente de la formulación ensayada, las PSN inducen una respuesta inmune mediada por células secretoras de IFN- γ ante el estímulo viral *in vitro*, y que controla la carga viral tras el reto en el modelo de encefalitis viral en ratones. La administración de la formulación tetravalente en primates no humanos generó también una respuesta inmune mediada por células productora de la citocina antiviral contra los cuatro serotipos del virus que además redujo significativamente la viremia tras el reto con dengue-3, serotipo para el cual se obtuvo la menor respuesta inmune. **Conclusiones:** Se desarrolló un candidato vacunal que no induce inmunoamplificación mediada por anticuerpos y es capaz de disminuir significativamente la carga viral en modelos de infección por virus dengue en ratones y monos, lo que aun sin generar una inmunidad esterilizante puede modificar potencialmente el escenario clínico al proteger de la enfermedad por dengue o proteger de la forma severa de la enfermedad con un alto perfil de seguridad.

Autor para la correspondencia:

Dr. Lázaro Gil González

E-mail: lazaro.gil@cigb.edu.cu FAX: (53-7) 271-4764

Ave. 31 e/ 158 y 190, Cubanacán, Playa. PO Box. 6162, Ciudad de la Habana 10600, Cuba.

7 ca i b]WU]OB 7 cfHU

El dengue es una enfermedad causada por un complejo viral de cuatro serotipos denominado virus dengue (VD) que pertenece al género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae*. La infección por cualquiera de los cuatro serotipos puede conllevar a la fiebre del dengue (FD) u ocasionar una forma más severa de la enfermedad conocida como la fiebre hemorrágica del dengue (FHD) que en ocasiones se acompaña del síndrome de choque por dengue (SCD). Varios estudios proponen que las manifestaciones severas durante una segunda infección se deben entre otros factores, a la ocurrencia de un fenómeno denominado Amplificación Dependiente de Anticuerpos (ADA) dada la existencia de anticuerpos de reactividad cruzada que se producen durante una infección previa. La presencia de estos anticuerpos pudiera resultar en un aumento de la carga viral, debido a que forman complejos virus- anticuerpos que se concentran en la superficie de las células dianas, facilitando la infección de las mismas.

Estudios en ratones publicados en los últimos años señalan además el papel protector de la inmunidad mediada por células contra VD. El dengue es un virus no citopático que estimula la expresión de moléculas del sistema principal de histocompatibilidad clase I (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) en las células que infecta, por lo que la respuesta inmune celular debe constituir un mediador importante del sistema inmune adaptativo contra este patógeno. Resultados descritos recientemente señalan además la seguridad de este tipo de respuesta sin asociación con la inmunopatogénesis de la enfermedad durante una infección secundaria tanto en ratones como en humanos. Por lo tanto, contar con un candidato vacunal que induzca solamente una respuesta celular protectora contra los cuatro serotipos virales, constituye una ventaja sobre candidatos basados en la generación de anticuerpos antivirales. Estos últimos podrían sensibilizar a los individuos vacunados con una formulación tetravalente, de no desarrollarse una respuesta de larga duración o equivalente.

Dentro de los posibles antígenos con potencialidad de inducir únicamente una respuesta inmune celular, se encuentra la proteína de la cápsida (C) la cual no posee regiones expuestas en la superficie del virión maduro ^{1,2}, por lo cual los anticuerpos generados contra esta proteína nunca mediarán el fenómeno de ADA. Teniendo en cuenta estos antecedentes, en el proyecto Vacuna Dengue, desarrollado entre el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y el Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" se obtuvo la construcción genética que expresa la proteína recombinante C del VD2 ³ y se observó que la misma forma partículas semejantes a nucleocápsidas (PSN-2), al ser incubada con oligodesoxinucleótidos (ODN). El presente trabajo tiene como objetivo evaluar la inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones de las PSN-2 y a partir de los resultados obtenidos, tomados como prueba de concepto, obtener y evaluar en ratones y monos la inmunogenicidad y capacidad protectora de las PSN correspondientes a los restantes serotipos.

Principales resultados y originalidad científica

Este trabajo demuestra que la proteína de la cápsida del VD2 forma PSN que inducen una respuesta mediada por células CD4+ y CD8+ productora de IFN- γ , que contribuye significativamente a controlar la carga viral tras reto.

La función principal de la cápsida de los *flavivirus* es la protección del ARN a través de la unión al mismo. Por lo tanto, con el objetivo de obtener estructuras en forma de partículas, esta proteína se incubó con una mezcla de oligodesoxinucleótidos (ODNs) de 45 bases en una relación molecular 3:1 siguiendo el procedimiento descrito por Wengler y cols. (1984) para obtener partículas de la nucleocápsida de los *alfavirus*. La formación de Partículas Semejantes a Nucleocápsidas (PSN), como resultado del proceso anterior, se analizó mediante tinción negativa visualizada por microscopía electrónica. En la figura 1 se muestran las fotos de este proceso de formación de partículas.

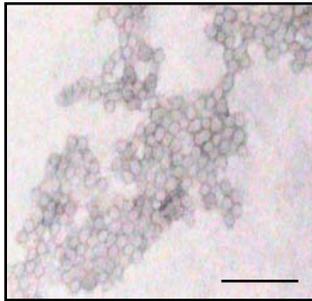


Figura 1: Microfotografía del producto del proceso de formación de partículas.

Cápsida dimérica en tampón de formación de partículas, incubada con ODNs en una relación molecular 3:1. La barra equivale a 200 nm. El análisis del tamaño y el número de partículas se realizó empleando el programa ImageJ (versión 1.33), a partir de cinco microfotografías diferentes.

Las PSN-2 obtenidas mostraron una morfología esférica con un diámetro promedio de $27,6 \pm 3,2$ nm y se contaron alrededor de $192,5 \pm 22,2$ partículas/campo. El tamaño de las partículas fue muy cercano al referido para la nucleocápsida viral nativa (datos no mostrados).

Con el objetivo de evaluar la capacidad de las PSN-2 de inducir una respuesta inmune celular funcional contra VD, se inocularon ratones BALB/c, con 10 μ g PSN-2 (tres dosis cada 15 días). Como control negativo (CN) se utilizó una formulación placebo que contuvo igual cantidad de ODNs que la empleada en el proceso de formación de partículas. En todos los casos se empleó alúmina como adyuvante. Como control positivo del experimento un grupo de animales se inmunizó con una sola dosis de VD2.

La aparición de anticuerpos reactivos a la proteína recombinante o al VD2 se detectó mediante un sistema de ELISA 30 días tras la tercera dosis. Los animales inmunizados con las PSN-2 generaron títulos de anticuerpos anti-cápsida, estadísticamente significativos con respecto al grupo control negativo; sin embargo, estos anticuerpos no reconocieron al virus, ni neutralizaron la infección viral *in vitro* (datos no mostrados). La figura 2A muestra que la inoculación con la formulación de PSN-2 generó células capaces de secretar altos niveles de IFN- γ ($1578,8 \pm 180,5$ pg/mL), tras la estimulación viral *in vitro* de los esplenocitos 30 días después de la última dosis. Además, la inmunización con las PSN-2 generó una respuesta similar a la observada en los animales inmunizados con VD2 ($1950,1 \pm 317,8$ pg/mL) ($p > 0,05$).

Adicionalmente, como se refleja en la figura 2B, la eliminación de las poblaciones celulares CD4⁺ y CD8⁺ afectó significativamente la secreción de la citocina ($p < 0,001$) con respecto a los niveles detectados en el sobrenadante de cultivo de los esplenocitos totales. Similar comportamiento se observó para los animales inmunes a VD2. Treinta días después de la última dosis los animales de cada grupo se retaron por vía intracraneal con 50 DL₅₀ de una cepa de VD2 neuroadaptada. Al final del período de observación, el 100% de los animales inmunes a VD2 sobrevivieron, mientras que el 90% de los animales del grupo control negativo mostraron síntomas de encefalitis y murieron. A su vez, el 80% de los animales previamente inmunizados con la formulación de PSN-2, controlaron la encefalitis viral y permanecieron vivos al final del período de observación (Figura 2B). Además se observó que la inoculación previa al reto, con un AcM capaz de eliminar las poblaciones celulares CD4⁺, conllevó a la aparición de síntomas de encefalitis y finalmente a la muerte del 90% de los animales. Por otra parte, la inoculación con un AcM que elimina las poblaciones celulares CD8⁺, afectó en un 40% la sobrevivencia que se alcanza en los animales no tratados con los AcM (Figura 2B).

Tras estos resultados nos propusimos obtener las proteínas correspondientes a los restantes serotipos virales y evaluar su inmunogenicidad y capacidad protectora en ratones y primates no humanos.

Células de *E. coli* BL21 (DE3) se transformaron con los plasmidios pACC1, 2, 3 y 4, obtenidos previamente en el proyecto Vacuna Dengue del CIGB. Estos plasmidios contienen el fragmento genético que codifica para las proteínas recombinantes C de cada serotipo del VD. La expresión de las proteínas se realizó en fase media exponencial, bajo la señal regulatoria del promotor T7lac, utilizando el IPTG como agente inductor.

El análisis por SDS-PAGE al 15 % detectó en cada caso, la sobreexpresión de una banda de aproximadamente 15 kDa, que se correspondió con el 15-18 % del total de las proteínas bacterianas. Estas bandas se inmunoidentificaron con el AcM 8H8 que reconoce un epitopo conservado para las cuatro variantes proteicas (datos no mostrados). La proteínas se purificaron mediante un único paso

de cromatografía de intercambio iónico como previamente se describió para la proteína C-2. La pureza de la proteínas estuvo alrededor de $91.25 \pm 1.5 \%$, con un rendimiento de $89.75 \pm 3.9 \%$.

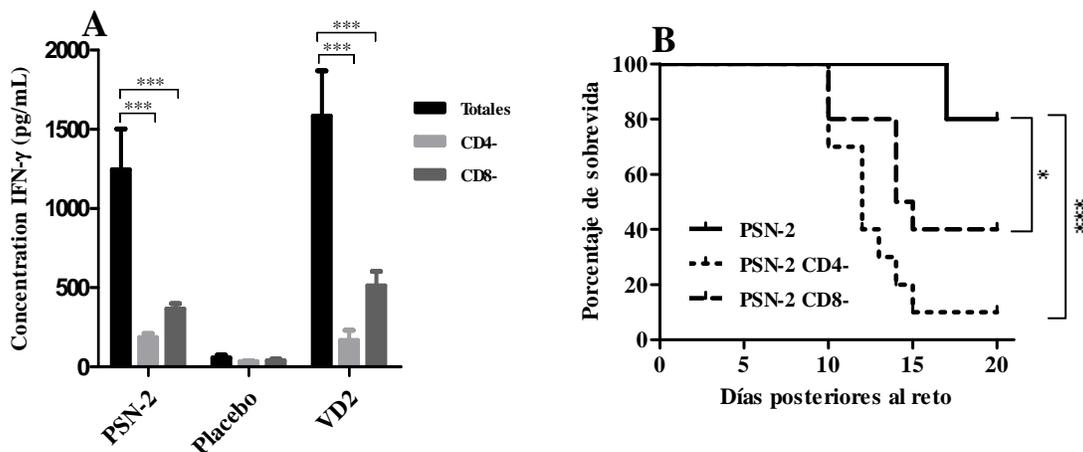


Figura 2: Respuesta inmune humoral, celular y protectora inducida por las PSN-2 en ratones BALB/c.

(A): Respuesta inmune celular. Los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con las PSN-2 se cultivaron con 10^3 ufp de VD2 durante 96 horas. Los datos representan los niveles de secreción de IFN- γ a partir de esplenocitos deficientes de células CD4⁺ o CD8⁺, con respecto a esplenocitos totales. El análisis estadístico se realizó mediante un ANOVA de clasificación doble empleando la prueba de Bonferroni (***: $p < 0,001$). Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar (n=5). (B) Curvas de supervivencia de ratones inmunizados con las PSN-2, ratones inmunizados con las PSN-2 deficientes de células CD4⁺ (CD4-) y ratones inmunizados con las PSN-2 deficientes de células CD8⁺ (CD8-). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de log-rank (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$) (n=10).

Seguidamente las proteínas se incubaron con el ODN 39M (5'-GGGGGACGATCGTCGGGGG ATCGACTCTCGAGCGTTCTC -3') previamente diseñado en el laboratorio y de probada actividad inmunopotenciadora. De forma similar a como se observó para la proteína C-2 las proteínas de los restantes serotipos formaron PSN.

A continuación, se evaluó en ratones BALB/c la inmunogenicidad y capacidad protectora de la formulación tetravalente compuesta por la mezcla PSN de cada serotipo viral (Tetra PSN). Como control negativo, un grupo recibió una preparación placebo que contuvo la misma cantidad del ODN 39M administrada en la formulación tetravalente (CN). Todas las formulaciones se adyugaron en alúmina. Como controles positivos se incluyeron cuatro grupos inmunizados con cada serotipo viral. Los animales recibieron cuatro dosis los días 0, 7, 21 y 51.

Tetra PSN indujo altos títulos de anticuerpos anti-recombinantes contra las cuatro proteínas C y estos anticuerpos no reconocieron los VD, ni neutralizaron la infección viral *in vitro* (datos no mostrados). Con el objetivo de medir la respuesta inmune celular generada por Tetra PSN 30 días después de la última dosis, se determinó la frecuencia de células productoras de IFN- γ mediante un ensayo de ELISpot. Como resultado se observó que el 100 % de los animales inmunizados con Tetra PSN mostró una respuesta positiva, estadísticamente similar a la que se observó en los animales inmunizados con los VD (Figura 3A).

Una vez demostrada la inducción de una respuesta inmune mediada por células, específica a los VD, en los animales inmunizados con Tetra PSN, se estudió su capacidad protectora en el modelo de encefalitis viral en ratones. Como se observa en la figura 3B los animales inmunizados con esta formulación, tuvieron una carga viral significativamente menor que los animales inmunizados con la formulación placebo ($p < 0,05$). En los animales inmunizados con las preparaciones virales (VD1-4) no se detectaron partículas virales infectivas.

Luego de demostrar en ratones la capacidad de la formulación Tetra PSN de inducir una respuesta inmune celular protectora, nos propusimos evaluar la inmunogenicidad de esta formulación en primates no humanos. Dos grupos de monos verdes africanos recibieron dos preparaciones de esta formulación, que contuvieron 5 μ g de cada proteína C en forma de PSN obtenida tras la incubación

con 2,5 µg o 25 µg del ODN 39M, respectivamente. O sea, un grupo recibió 20 µg de Tetra PSN formulada con 10 µg del ODN 39M, mientras que el otro recibió 20 µg de Tetra PSN formulada con 100 µg del ODN 39M. Estos dos grupos nos permitirían estudiar el posible efecto inmuno-estimulador del ODN 39M en monos inmunizados con Tetra PSN. Como control un grupo de animales se inmunizó con una formulación placebo que contuvo 100 µg del ODN 39M. Todas las formulaciones se adyuvaron en alúmina y los animales recibieron tres dosis los días 0, 60 y 120. La respuesta inmune humoral y celular se evaluó 30 días después de la última dosis.

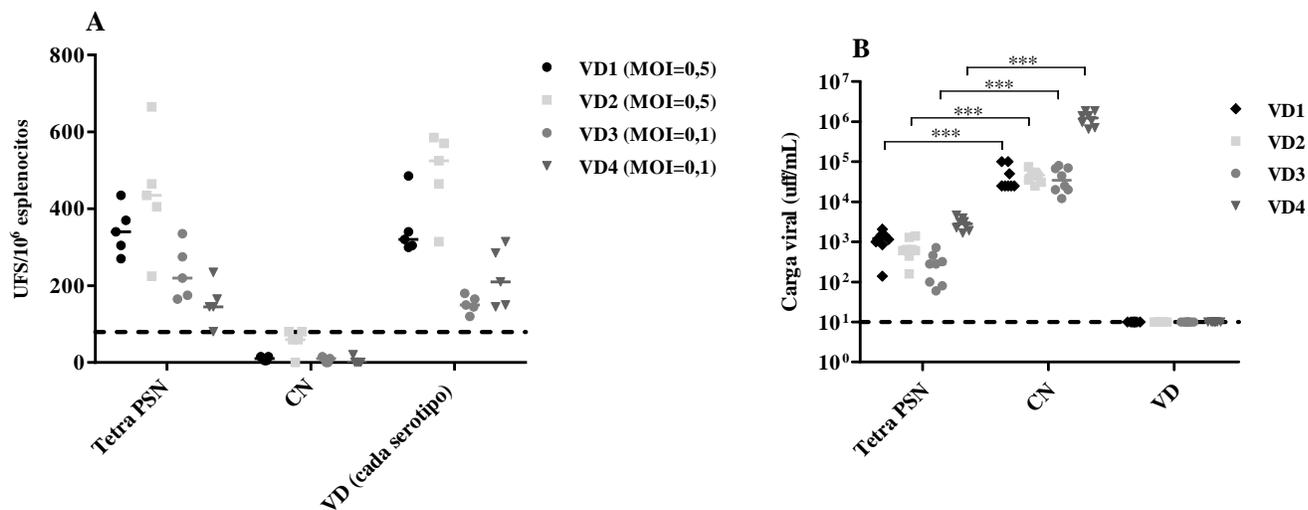


Figura 3: Respuesta inmune celular y protectora generada por la formulación tetravalente de las PSN en ratones BALB/c. (A): Treinta días después de la última dosis, los esplenocitos provenientes de ratones inmunizados con las diferentes formulaciones se cultivaron con los VD durante 96 horas. La línea discontinua indica el criterio de positividad (doble del promedio de los valores del grupo CN más la desviación estándar y además superior a 50 ufs/millón de células). Los datos se presentan como la mediana (n=5). (B): Carga viral en el cerebro de los animales 7 días después del reto intracraneal con 50 DL₅₀ de los VD (cepas letales neuroadaptadas). El virus se cuantificó mediante aislamiento directo en células VERO. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal Wallis y la comparación múltiple a posteriori de Dunn (***: p<0,001). Los datos se presentan como la mediana (n=7-8). La línea discontinua representa el límite de detección del ensayo. En ambos casos los gráficos son representativos de dos experimentos independientes.

En concordancia con los resultados observados en ratones, los sueros de los monos inmunizados con Tetra PSN reconocieron las cuatro proteínas C, pero como era esperado estos anticuerpos no reconocieron a los VD, ni neutralizaron la infección *in vitro* para ninguno de los serotipos virales (datos no mostrados). Sin embargo, cuando se evaluó la respuesta inmune celular midiendo los niveles de IFN-γ en el sobrenadante de cultivo de los PBMC de los animales estimulados *in vitro* con cada VD, observamos que la secreción de la citocina antiviral dependió de la cantidad de ODN 39M empleada en el proceso de formación de las PSN (Figura 4A). En los animales del grupo CN no se observó respuesta, a pesar de la alta dosis de ODN 39M administrada.

Teniendo en cuenta los resultados de la respuesta inmune celular generada en los primates no humanos tras la administración de la preparación de Tetra PSN que contuvo 100 µg del ODN 39M, decidimos evaluar la capacidad protectora de esta preparación. Los animales se retaron 15 días después de haber evaluado la respuesta inmune celular (45 días después de la última dosis), con 10² unidades formadoras de focos (ffu) de VD3 (cepa Nicaragua) VD3, pues fue para este serotipo para el que se obtuvo la menor respuesta de secreción de IFN-γ. Como resultado observamos que los animales del grupo que recibió la preparación placebo desarrollo viremia con una duración de 4,5 días y una carga viral máxima de 10^{3,3} uff/mL. Sin embargo, la viremia detectada en los animales inmunizados con Tetra PSN tuvo una duración de 2,7 días con una carga viral máxima de 10^{2,5} uff/mL. Tras la comparación de la viremia en ambos grupos se observó una reducción significativa de la carga viral en los animales inmunes a las PSN con respecto a los animales del grupo CN, los días cinco,

seis, siete y ocho posteriores al reto ($p=0,011$; $p=0,04$; $p=0,037$ y $p=0,037$, respectivamente) (Figura 4B).

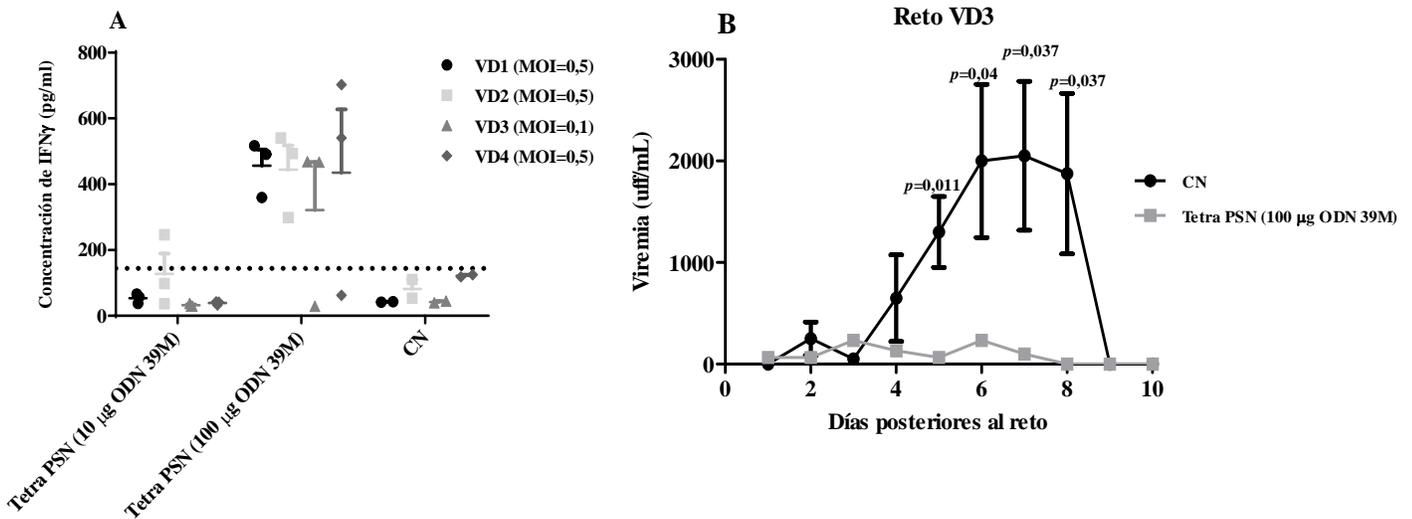


Figura 4: Respuesta inmune celular y protectora inducida en primates no humanos por la formulación Tetra PSN.

(A): Treinta días después de la última dosis, los PBMC provenientes de monos inmunizados con las dos preparaciones de Tetra PSN y la formulación placebo se cultivaron con los VD durante 96 horas. La concentración de IFN- γ secretada al medio de cultivo se determinó mediante un ELISA. Los datos se presentan como la media \pm la desviación estándar ($n=3-4$). La línea discontinua indica el criterio de positividad (doble del promedio de los valores del grupo CN). (B): Cuarenta y cinco días después de la última dosis los animales se retaron con 10^2 uff de VD3 cepa Nicaragua. La viremia se cuantificó durante 10 días después del reto mediante aislamiento directo en células VERO. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney comparando la viremia por día. Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media de dos experimentos independientes ($n=3-4$). En ambos casos, los gráficos son representativos de dos experimentos independientes.

Impacto social y económico

El Dengue y el Dengue severo adquieren cada vez mayor importancia como problemas de salud, con alrededor de 350 millones de casos de Dengue, de ellos 96 millones desarrollan algún grado de severidad. En Cuba han ocurrido varias epidemias bien definidas, entre las cuales se destacan la del 1981 y 1997. A pesar de los numerosos esfuerzos que se realizan para eliminar el agente transmisor, contar con una vacuna efectiva sería una solución de gran impacto social y económico. La vacuna Dengvaxia®, recientemente registrada por la compañía Sanofi Pasteur, no podrá ser administrada en niños menores de nueve años de edad por problemas de seguridad y eficacia protectora; por lo que deja un grupo etario altamente susceptible desprovisto de vacunación.

Los resultados de este trabajo demuestran la capacidad protectora en ratones y monos de las PSN, un candidato vacunal alternativo contra los VD, que no induce anticuerpos antivirales. Sin embargo, esta última cuestión le imprime a este candidato ventajas únicas con respecto a los candidatos actuales en desarrollo, pues al no inducir una respuesta humoral antiviral, nunca va a inducir el fenómeno de amplificación viral dependiente de anticuerpos, que está asociado a la inmunopatogénesis de la enfermedad. Además Tetra PSN, induce una respuesta inmune celular funcional, que disminuye significativamente la carga viral tras reto y que no debe sensibilizar frente a la infección viral. Estos dos elementos de seguridad asociados a este candidato, hacen que se pueda avanzar a las fases clínicas a una mayor velocidad que en el caso de candidatos basados en la inducción de anticuerpos neutralizantes. Sabemos que las PSN como estrategia vacunal alternativa no generan una inmunidad esterilizante; sin embargo, la disminución de la carga viral puede cambiar dos escenarios clínicos importantes: de un dengue severo a un dengue clásico o de un dengue clásico a una infección sub-clínica. Contar con un candidato vacunal contra este patógeno humano reviste gran importancia teniendo en cuenta la expansión global que ha alcanzado la enfermedad y los costos que implican el control del vector trasmisor el virus, que resulta ser la única forma actual de controlar las epidemias.