

1. Presentación

Título: Obtención de candidatos vacunales novedosos contra la Tuberculosis.

Unidad Ejecutora Principal: Instituto Finlay.

Autores Principales: DrC. Nadine Alvarez Cabrera¹, MsC. Yanelly Tirado Hernández¹, DrC. María Elena Sarmiento¹, DrC. Armando Acosta¹,

Otros autores: MsC. María de los Ángeles García¹, DrC. Norazmi Mohd-Nor³, DrC. Rogelio Hernández-Pando², MsC. Sonsire Fernández¹, DrC. José Luis Pérez¹, DrC. Reinaldo Acevedo¹, MsC. Alina Puig¹, MsC. Reinier Borrero¹, DrC. Alicia Aguilar¹.

Colaboradores: 8

Filiación de los autores: ¹ Instituto Finlay de Vacunas. Cuba. ² Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México, D.F. ³ Universidad de Sains Malasia, Malasia.

Autores Principales:

DrC. Nadine Alvarez Cabrera

Instituto Finlay de Vacunas, BioCubaFarma, Ave 27, No. 19805. La Coronela. La Lisæ A.P.16017 Cód.11600. La Habana. Tel: 72716911, ext. 105.

E-mail: nalvarez@finlay.edu.cu

Resumen

La presente propuesta de Premio a la ACC describe la obtención, en el Instituto Finlay, de novedosos y potenciales candidatos profilácticos contra la Tuberculosis obtenidos a partir de micobacterias no patogénicas (*Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis* BCG). El trabajo realizado forma parte de un proyecto de colaboración internacional entre el Instituto Finlay y la Universidad de Sains Malasia (USM). La tuberculosis (TB) es la primera causa de muerte en el mundo debido a una enfermedad infecto-contagiosa y anualmente cobra alrededor de 1.5 millones de muertes. Desde 1921 existe una única vacuna disponible para prevenir la enfermedad (BCG), sin embargo esta posee marcadas desventajas debido a que tiene una eficacia limitada (entre 10 y 20 años), solo protege contra las formas meníngea y miliar en la infancia y no protege contra la forma pulmonar de la TB en adultos, aspecto crítico teniendo en cuenta que esta constituye la forma más frecuente de la enfermedad y la responsable de la transmisión. Para el tratamiento de la TB se aplica una combinación de antibióticos por un largo período de tiempo y debido al escaso acceso a esta terapia y al abandono del tratamiento, circulan actualmente en el mundo cepas que ofrecen diferente grado de resistencia a estas drogas, existiendo ya cepas totalmente resistentes. Todo lo anterior justifica la urgente necesidad de desarrollar un candidato vacunal novedoso que mejore, sustituya o refuerce la vacunación con BCG. El objetivo del presente trabajo consistió en la obtención y evaluación de candidatos vacunales contra la tuberculosis a partir de proteoliposomas (PLs) y extracto lipídico de micobacterias que comparten elevado grado de homología con *Mycobacterium tuberculosis* pero que no son patogénicas, lo cual constituye una considerable ventaja. El Instituto Finlay tiene experiencia de más de dos décadas en la obtención de PLs a partir de bacterias lo cual constituye una fortaleza para la obtención y desarrollo de estos candidatos. Entre los candidatos vacunales contra la tuberculosis que actualmente se encuentran en diferentes fases de evaluación a nivel mundial, ninguno es basado en nuestra estrategia. Para la aprobación del estudio en humanos de un nuevo candidato vacunal contra la tuberculosis se exige demostrar su capacidad protectora en diferentes etapas preclínicas: 1^{ra} fase en modelo ratón, 2^{da} fase en modelo curiel (debido a la alta susceptibilidad de esta especie a la infección con *M. tuberculosis*) y opcionalmente 3^{ra} fase en primates no humanos. De igual modo, se han establecido indicadores claves de protección en estos modelos los cuales incluyen la reducción de la carga bacteriana y del área neumónica en pulmón. En nuestro estudio demostramos la capacidad antigénica de los PLs y del extracto lipídico en humanos, la inducción por parte de estos candidatos de una elevada respuesta inmunológica en ratones, así como un elevado reconocimiento de antígenos de *M. tuberculosis*, todo lo cual nos permitió avanzar a los estudios de reto empleando un modelo de infección progresiva experimental. Como resultado, se demostró la capacidad protectora de los candidatos en estudio mediante la reducción significativa de la carga bacteriana y del área neumónica en pulmón, cuando los PLs se administraron adyuvados con hidróxido de aluminio como estrategia de refuerzo a la vacunación con BCG y cuando se administró el extracto lipídico de *M. smegmatis* adyuvado con hidróxido de aluminio, como candidato que podría sustituir la vacunación con BCG. Los candidatos estudiados están en estos momentos avalados para avanzar a la siguiente fase de evaluación preclínica. Los resultados se incluyen en 7 publicaciones científicas internacionales, 3 publicaciones nacionales, 1 capítulo de libro

internacional y 2 libros. Esta investigación fue la base de la defensa de diversas Tesis de Licenciatura, Maestría y de Terminación de Especialidad Inmunología, así como se presentaron los resultados contenidos en la misma en diferentes eventos científico-técnicos de carácter nacional e internacional, incluyendo Premio Relevante del Fórum de Ciencia de Técnica a nivel de base.

3. Comunicación corta

Introducción

El Instituto Finlay cuenta con una vasta experiencia en la obtención de PLs desde la obtención de la vacuna VAMENGOC-BC® contra la enfermedad meningocócica causada por el serogrupo B de *Neisseria meningitidis*. A pesar de los esfuerzos por erradicar la tuberculosis (TB) a nivel mundial, esta enfermedad se reafirma como un crítico problema de salud, encontrándose entre las tres primeras causas de muerte debido a enfermedades infecciosas (1). En el año 2013 se notificaron 9 millones de nuevos casos y ocurrieron 1,5 millones de defunciones a nivel mundial (1). El control de la TB se ha visto afectado por la aparición de cepas multidrogo-resistente (MDR) y extremadamente-drogo-resistente (XDR) así como por la coinfección con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), además de la baja cobertura terapéutica y el diagnóstico tardío en muchos países (1). Hasta el momento, la única vacuna disponible contra la TB y aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para uso en humanos, es BCG, cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), sin embargo induce una protección extremadamente variable. El amplio rango de protección conferido en las diversas regiones donde ha sido aplicada, varía entre una protección nula hasta un 80% (2). Aunque BCG ha mostrado protección contra las formas graves de la enfermedad en la infancia, se cuestiona su efectividad en la prevención de la TB pulmonar del adulto (forma más frecuente y responsable de la transmisión de la infección) (2). Una estrategia novedosa y aún no explorada como candidatos contra la TB se basa en el uso de PLs. Los PLs derivados de microorganismos son extractos de membrana celular compuestos principalmente por lípidos y proteínas (3). Se forman en presencia de detergentes apropiados, mediante interacciones hidrofóbicas entre los componentes de la pared celular y las moléculas del detergente (4). Esta característica permite la conformación de estructuras vesiculares carentes de virulencia pero que presentan los determinantes antigénicos de las bacterias que le dieron origen (5). Previamente, se ha descrito el uso de PLs en la preparación de vacunas profilácticas contra enfermedades infecciosas, no solo como componente antigénico principal, sino también como inmunoadyuvantes (6-9). Las vacunas VA-MENGOC-BC® y MeNZB®, obtenidas por Cuba y Nueva Zelanda respectivamente, son ejemplos de vacunas basadas en el proceso de obtención de PLs con detergentes y que han demostrado ser efectivas en el control de la enfermedad meningocócica (6, 10). A pesar de existir varios estudios que avalan las potencialidades de los PLs en la vacunología (11, 12), en la actualidad existen muy pocas vacunas licenciadas basadas en PLs. En nuestro trabajo obtuvimos PLs y un extracto lipídico a partir de micobacterias no patógenas que poseen un elevado por ciento de homología con *M. tuberculosis*. El empleo de micobacterias no patógenas, representa una gran ventaja debido a la no obligatoriedad del uso de instalaciones BSL 3 para su manejo.

Discusión y Resultados

-Estudio *in silico* de la presencia potencial de epitopes relevantes de *M. tuberculosis* en los candidatos vacunales

Se identificaron proteínas homólogas a *M. tuberculosis* en las micobacterias no patógenas evaluadas, mediante alineamiento de secuencia y se identificó que las mismas están localizadas en citoplasma, membrana y pared celular, lo cual

favorece su extracción mediante los métodos de obtención de PL basado en detergentes.

-Obtención y Caracterización de Proteoliposomas y Extracto lipídico

Las vesículas de membrana externa (VME) o proteoliposomas de microorganismos han sido utilizadas en el desarrollo de vacunas, como por ejemplo VAMENGOC-BC (13). Estas VME exhiben propiedades antigénicas e inmunológicas relevantes, que han permitido su efectiva aplicación en la vacuna por más de 25 años y también su uso como adyuvante en candidatos que se encuentran en desarrollo. Por otro lado, los extractos lipídicos derivados de patógenos constituyen una fuente para el desarrollo de candidatos vacunales (14). Haciendo uso de la fortaleza del Instituto Finlay en la obtención de PLs derivados de bacterias con capacidad vacunal y adyuvante, nos propusimos obtener PLs derivados de micobacterias no patógenas. El proceso de extracción/purificación se adaptó del original (13), teniendo en cuenta las características morfológicas/estructurales de las micobacterias. Las micobacterias utilizadas en el proceso de obtención de los PLs fueron *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG (PLMs y PLBCG, respectivamente). La solubilización de los componentes de la pared se logró mediante el empleo de deoxycolato (DOC) como detergente y se caracterizaron los PLs obtenidos mediante técnicas de electroforesis, inmunoquímicas, colorimétricas y espectroscópicas. Se determinó además el tamaño y las características morfológicas de las vesículas empleando microscopia electrónica de transmisión y difracción de luz (15). Como resultado se obtuvieron PLs nanoparticulados (alrededor de 200 nm) compuestos por estructuras esféricas. Para la obtención del extracto lipídico se utilizó *Mycobacterium smegmatis*, cuya biomasa se procesó mediante método de extracción empleando cloroformo-metanol seguido de proceso de deshidratación/rehidratación para reconstituir el extracto lipídico. Para la caracterización de los componentes presentes en dicha formulación se realizó una cromatografía de capa delgada similar a la descrita en la literatura (15).

-Estrategias experimentales desarrolladas para evaluar el carácter antigénico en humanos

Para la evaluación del carácter antigénico en humanos se emplearon sueros de personas sanas y enfermos con TB pulmonar activa. El criterio para la selección de los donantes sanos fue el tiempo de exposición a *M. tuberculosis*, seleccionándose para el estudio individuos con exposición de larga duración (más de 10 años), a los cuales se les realizó la prueba de la tuberculina. Como resultado positivo a dicha prueba se consideró toda induración en el sitio de inoculación del derivado proteico purificado (PPD) mayor o igual a 10 mm. Los enfermos incluidos en el estudio fueron pacientes con TB pulmonar activa cuyo diagnóstico se realizó atendiendo al cuadro clínico y se confirmó por baciloscopia y cultivo de *M. tuberculosis*. Se realizó ensayo de ELISA y Western blot para la determinación cuantitativa y cualitativa de anticuerpos humanos IgG reactivos. Adicionalmente se realizó la determinación de la producción de IFN- γ mediante ensayo de ELISA, como resultado de la estimulación de la sangre total de humanos con las formulaciones vacunales. La producción de IFN- γ en los individuos sanos (PPD+ y PPD-) fue significativamente superior con respecto al grupo de pacientes con TB pulmonar activa. Se ha descrito que la infección micobacteriana se caracteriza por el reclutamiento de células T CD4+ productoras de citoquinas tipo I, en

particular IFN- γ (2). Para ambos PLs se observaron mayores niveles de IgG reactiva en el suero de pacientes con TB pulmonar activa, con respecto a los observados en el suero de individuos sanos (ya sean PPD+ o PPD-).

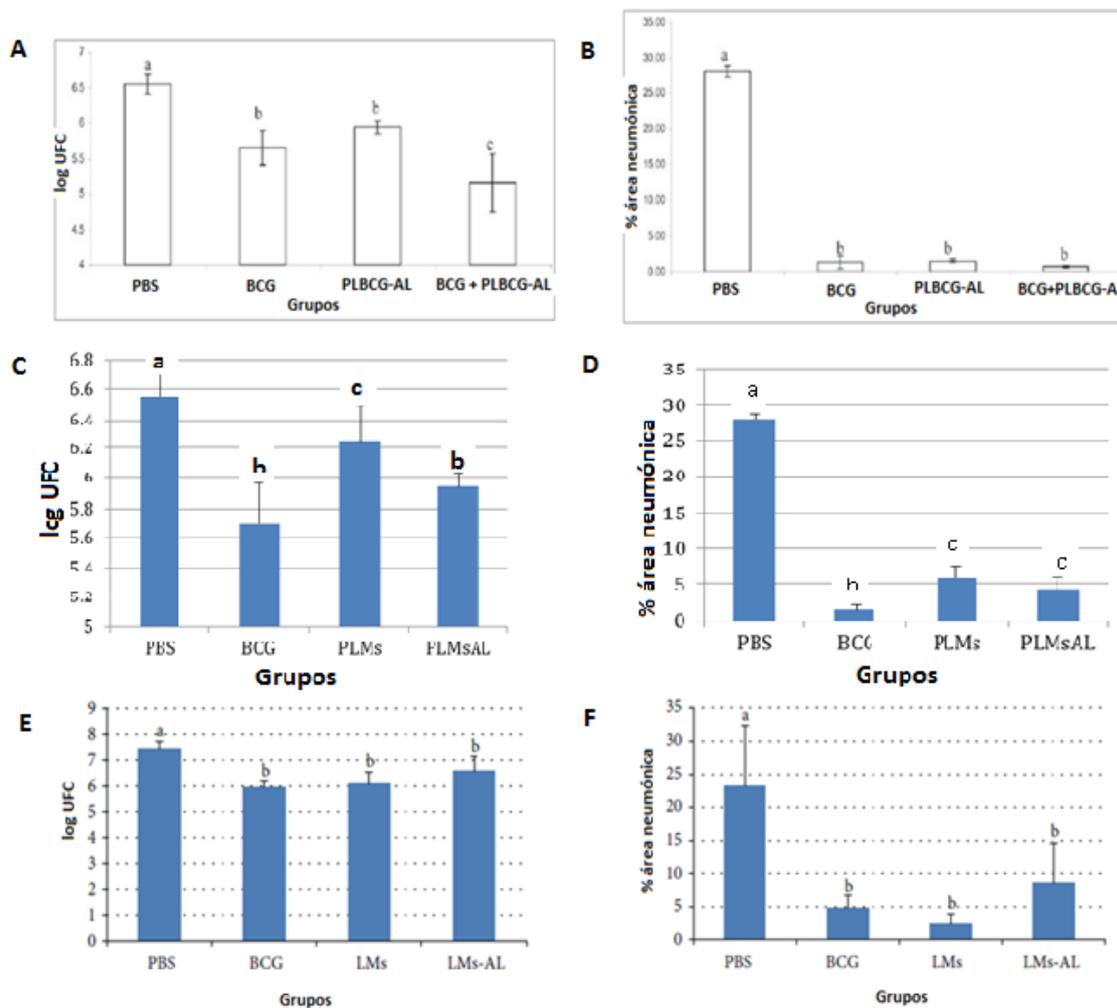
-Evaluación de la respuesta inmune humoral y celular inducida por los candidatos

La respuesta inmune humoral inducida por las formulaciones vacunales se evaluó mediante ensayo de ELISA y Western blot. Se demostró que todas las preparaciones vacunales fueron capaces de inducir respuesta específica de IgG así como respuesta de reactividad cruzada contra *M. tuberculosis* en ratones Balb/c. En las formulaciones vacunales de PLs el uso de hidróxido de aluminio incrementó los niveles de respuesta. El patrón de reconocimiento observado y las tallas de las bandas obtenidas mediante Western blot sugieren la presencia de proteínas homólogas con antígenos de *M. tuberculosis* con importante papel en la virulencia. Los PLs y el extracto lipídico obtenidos a partir de estas micobacterias no patógenas al parecer contienen proteínas o epitopes con capacidad potencial de inducir respuesta inmune contra *M. tuberculosis* en ratones Balb/c.

-Determinación de la capacidad protectora de los candidatos frente la infección con *M. tuberculosis*

La capacidad protectora de los PLs y del extracto lipídico se evaluó mediante la determinación de la carga bacilar y el área neumónica en pulmones de ratones infectados, dos meses después de la infección con *M. tuberculosis*. Los resultados mostraron una reducción significativa de la carga bacteriana y del por ciento del área neumónica en los animales que recibieron PLBCG adyuvado con hidróxido de aluminio y empleado como refuerzo de la vacunación con BCG. Por otro lado, el PLMs y el extracto lipídico obtenido de *M. smegmatis* también redujeron de manera significativa los parámetros mencionados anteriormente, con respecto al grupo no tratado (Fig.2), cuando se emplearon como candidatos vacunales que podrían reemplazar la vacunación con BCG.

Figura 1. Demostración de la capacidad protectora de los candidatos vacunales basados en PLs y extracto lipídico obtenidos a partir de micobacterias no patogénicas frente a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. A y B, PL derivado de *Mycobacterium bovis* BCG; C y D, PL derivado de *Mycobacterium smegmatis*; E y F, extracto lipídico de *Mycobacterium smegmatis*. A, C y E: determinación de carga bacteriana en pulmón; B, D y F: determinación del porcentaje de área neumónica en pulmón. Letras diferentes significan diferencias significativas.



Conclusiones

En este trabajo se describieron los principales resultados de siete años de investigación dirigida a la obtención y estudio de posibles candidatos vacunales contra la tuberculosis mediante estrategias novedosas y no empleadas hasta el momento para esta enfermedad. La novedad del presente trabajo radica en que no existe otro candidato vacunal en el mundo contra la TB que se base en la estrategia de PL o extracto lipídico y que haya demostrado ser protector contra la infección por *M. tuberculosis*.

Bibliografía

1. World Health Organization. Global Tuberculosis Report 2014. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data: 1-106.
2. Montagnani C, Chiappini E, Galli L, de Martino M. Vaccine against tuberculosis: what's new? BMC Infect Dis 2014; 14(Suppl. 1):S2.
3. Pérez JL, Acevedo R, Callicó A, Fernández Y, Cedré B, Año G, et al. A proteoliposome based formulation administered by de nasal route produces vibriocidal antibodies against El Tor Ogawa Vibrio cholera O1 in BALB/c mice. Vaccine 2009; 27(2):205-212.
4. de Diego JL, Gerold G, Zychlinsky A. Sensing, presenting and regulating PAMPs. Ernst Schering Found Symp Proc 2007; (3):83-95.
5. Sierra G. Is a new tuberculosis vaccine necessary and feasible? A Cuban opinion. Tuberculosis 2006; 86(3-4):169-78.
6. Sierra G, Campa HC, Varcacel NM, Izquierdo PL, Sotolongo PF, Casanueva GV, et al. Vaccine against group B Neisseria meningitidis: Protection trial and mass vaccination results

in Cuba. NIPH Ann 1991; 14(2):195-207.

7. Sotolongo F, Campa C, Casanueva V, Fajardo EM, Cuevas IE, González N. Cuban Meningococcal BC Vaccine: Experiences and Contributions from 20 Years of Application. MEDICC Rev 2007; 9(1): 16-22.

8. del Campo J, Lindqvist M, Cuello M, Bäckström M, Cabrera O, Persson J, et al. Intranasal immunization with a proteoliposome-derived cochleate containing recombinant gD protein confers protective immunity against genital herpes in mice. Vaccine 2010; 28(5):1193-1200.

9. Acevedo R, Callicó A, Aranguren Y, Zayas C, Valdés Y, Pérez O, et al. Immune adjuvant effect of *V. cholerae* O1 derived Proteoliposome coadministered by intranasal route with Vi polysaccharide from *Salmonella Typhi*. BMC Immunol 2013; 14(Suppl.1):S10.

10. Oster P, Lennon D, O'Hallahan J, Mulholland K, Reid S, Martin D. MeNZBTM: a safe and highly immunogenic tailor-made vaccine against the New Zealand *Neisseria meningitidis* serogroup B disease epidemic strain. Vaccine 2005; 23(17-18):2191-2196.

11. Arnold R, Galloway Y, McNicholas A, O'Hallahan J. Effectiveness of a vaccination programme for an epidemic of meningococcal B in New Zealand. Vaccine 2011; 29(40):7100-6.

12. Fernández S, Fajardo EM, Mandiarote A, Año G, Padrón MA, Acosta M, et al. A proteoliposome formulation derived from *Bordetella pertussis* induces protection in two murine challenge models. BMC Immunol 2013; 14(Suppl 1):S8.

13. Campa C, Sierra VG, Gutiérrez MM, Bisset G, García L, Puentes G, et al. Método para la obtención de una vacuna de amplio espectro protector contra *Neisseria meningitidis* del serogrupo B y la vacuna resultante. Patente cubana CU 21888 A1; 1989.

14. Daffe M. The global architecture of the micobacterial cell envelope. In: *The Mycobacterial Cell Envelope*. Daffe M and Reyrat JM, editors. Washington, D.C.: ASM Press; 2008; pp. 3-12.

15. Alvarez-Cabrera, Nadine; Fernández-Castillo, Sonsire; Serpa-Almaguer, Daymí; Serrano-Hernández, Daily; Zayas-Vignier, Caridad; Cabrera-Arias, et al. Avances en la caracterización de un proteoliposoma derivado de *Mycobacterium bovis* BCG como candidato vacunal contra la tuberculosis. Vaccimonitor 2014; 23(3):110-116.