

## DESARROLLO DE VACUNAS USANDO BACTERIAS LACTICAS: Construcción y Expresión de Antígenos del VIH en *Lactobacillus*.

Itza Luna-Cruz, Cristina Rodríguez-Padilla, Roberto Montes-de Oca, Reyes Tamez-Guerra, Juan M. Alcocer-Gonzalez. Facultad de Ciencias Biológicas, Lab. de Inmunología y Virología. Edificio "C" Tercer piso. Pedro de Alba S/N, San Nicolás de los Garza, N.L. Cd. Universitaria C.P. 66450. Fax.83524212 E-mail: jalcocer@ccr.dsi.uanl.mx

Palabras clave: VIH, *Lactobacillus* y vacunas

**Introducción.** Vectores basados en bacterias recombinantes vivas representan una nueva tecnología para el desarrollo de vacunas. Para desarrollar vectores bacterianos recombinantes se utilizan principalmente dos estrategias: bacterias comensales, seguras e inocuas (bacterias ácido lácticas) y bacterias patogénicas atenuadas (*Salmonella*, *Shigella* y *Listeria*). Las bacterias ácido lácticas son microorganismos comensales de la mucosa intestinal y genital, además se han utilizado por muchos años en la industria de alimentos lácteos y por ende son bacterias comestibles, inocuas y amigables en la flora intestinal y vaginal. Estas bacterias son los vectores ideales para expresar antígenos heterólogos en mucosas (1,2). Por otro lado el SIDA (Síndrome de Inmunodeficiencia Humana), causado por el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) es el problema de salud pública más complejo en la actualidad, y cuyo impacto se refleja en la vida social y económica de nuestro país. Los esfuerzos para el desarrollo de una vacuna para prevenir la infección por el VIH están enfocados sobre la inducción de un anticuerpo neutralizante y la respuesta de linfocitos T citotóxicos (CTL) específicos del virus. La glicoproteína gp 120 y el asa V3 de gp 120 (sitio principal de neutralización por participar en la infectividad, tropismo y respuesta específica de CTL) son predominantemente utilizados para la formulación de una vacuna (3). Tomando lo anterior en cuenta, este trabajo está basado en el uso de *L. casei* recombinante para expresar en superficie la proteína gp 120 del VIH.

Nuestro propósito está basado en el uso de bacterias comensales recombinantes que expresen antígenos heterólogos como vacunas.

**Metodología.** Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar por PCR el gene de la gp120 del VIH-1 (gen bank KO3455) a partir del plasmido pSFV1 que contiene dicho gen y el producto fue purificado por el sistema Gene-Clean II y subclonado utilizando el sistema pGEM-T. El gene de la gp 120 fue liberado con Apa I y Xho I del vector pGEM-T y subclonado en los vectores de expresión pIL1252:P23:emm6 y pIL1252:P59:emm6, estos vectores contienen los promotores P23 y P59 respectivamente que son promotores específicos para *L. casei*. Por otro lado se diseñaron 3 pares de oligonucleótidos que amplifican la región V3 del gene de la gp 120, para la construcción del gene gp 120 con tres regiones V3. La transformación de *L. casei* con los vectores de expresión se llevó a cabo por electroporación (4). El análisis de la proteína recombinante gp 120-V3-3 producida en *L. casei* se llevó a cabo por Western Blot.

**Resultados y Discusión.** En primer lugar se optimizaron las condiciones para amplificar por PCR el gene completo de la gp 120 de la clona HXBR-2 a partir del plasmido

pSFV-1, así mismo también se optimizaron las condiciones para la amplificación del asa V3 del gene de la gp 120 con tres pares de iniciadores conteniendo diferentes sitios de restricción. Los productos del gene de la gp 120 y el asa V3 amplificados por PCR fueron clonados en el vector pGEM-T y las clonas transformadas en *E. coli* DH5 $\alpha$  conteniendo dichos plásmidos fueron identificadas mediante un método de obtención de plásmidos rápido. La gp 120 fue liberada del plasmido pGEM-T con los sitios Apa I y Xho I y subclonada en pIL1252: P59:emm6, posteriormente se llevó a cabo la electroporación de *L. casei*, para la obtención de clonas que expresan la gp 120 por medio de Western Blot, así mismo el gene del asa v3 fue subclonado en pIL1252:P59:emm6, la electroporación de *L. casei* fue realizada como anteriormente se mencionó para la obtención de clonas que expresen la región V3 en la superficie de esta bacteria.

**Conclusión.** En el presente estudio hemos clonado por PCR los genes de los antígenos del VIH más importantes en el desarrollo de vacunas. Estos genes fueron subclonados en vectores de expresión específicos de *Lactobacillus*, para producir una proteína quimérica fusionada a la proteína M de superficie, con la finalidad de producir *Lactobacillus* recombinantes que expresen antígenos heterólogos del VIH. Esta bacteria recombinante podrá ser utilizada como vector para inducir inmunidad en mucosa intestinal y genital contra el VIH.

### Bibliografía.

- 1.-Locht,C. (2000) Live bacterial vectors for intranasal delivery of protective antigens. *PSTT*, vol.(3):121-128.
- 2.-Mohamed,T,Stevceva,L. agwale,S. Lewis,G. Hone,D. (2000) Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors.*Mol. Med.Today*. vol.(6):66-71
- 3.-Wang,W.,Dudex,T.,Essex,M.,Tun-Hou,L.(1999) Hypervariable region 3 residues of HIV type-1 gp 120 involved in CCR5 coreceptor utilization: Therapeutic and prophylactic implications. *Proc, Natl. Acad.Sci*. vol.(96): 4558-4562.
- 4.-Maassen,C.(1999) A rapid and safe plasmid isolation method for efficient engineering of recombinant *Lactobacilli* expressing immunogenic or tolerogenic epitopes for oral administration. *J.Immunol. Meth.* vol.(223):131-136.