

# Desarrollo de una vacuna probiótica para el tratamiento del cáncer cérvico-uterino <sup>□</sup>

Inducción de una respuesta inmune contra el HPV-16 utilizando *Lactococcus lactis*

Naima Gisela Cortés Pérez\*, Luis Gilberto Bermúdez Humarán\*, Juan Manuel Alcocer González\*, Alexandra Gruss\*\*, Yves Le Loir\*\*, Phillipe Langella\*\*, Roberto Montes de Oca Luna Leal\*



La idea de manipular bacterias para la presentación de antígenos heterólogos no es nueva, pero está acentuada en la atenuación de organismos patógenos como *Salmonella sp.* y *Mycobacterium sp.*, ya que estos microorganismos son invasivos, esta característica puede ser un factor limitante en ciertos grupos vulnerables, como niños y pacientes inmunosuprimidos.

El uso de bacterias probióticas recombinantes para la presentación de antígenos de interés médico es una área de investigación en constante crecimiento; estos modelos ofrecen múltiples ventajas, principalmente en seguridad. Este trabajo se enfoca en el uso de la bacteria ácido láctica grado-alimenticio *Lactococcus lactis*, comúnmente conocida como organismo GRAS (Generally Regarded As Safe) para la expresión de la oncoproteína E7 del papilomavirus humano tipo 16 (HPV-16).

El HPV es el agente causal de las verrugas que crecen en manos, pies, boca y genitales. La infección genital por este agente es considerada como la enfermedad viral de transmisión sexual más común, pero lo más importante de este hecho es que algunos tipos de HPV's están involucrados en el desa-

rollo de cáncer, principalmente en el cáncer cervicouterino (CaCu). El factor de riesgo más importante para el desarrollo del CaCu es la infección con algún tipo de los HPV's catalogados como de alto riesgo (HPV-16). El CaCu representa un problema de salud para la humanidad<sup>1-3</sup> porque es el cáncer más común después del cáncer de mama;<sup>1</sup> sin embargo, en México el CaCu ha sido en la última década el cáncer más frecuente entre la población femenina.<sup>3</sup> Debido a esto, es de gran importancia obtener medidas eficaces para la prevención, el diagnóstico oportuno y la terapia contra el HPV y el CaCu.

Actualmente se realizan estudios encaminados a combatir este patógeno mediante vacunas, que serán de gran utilidad para el control médico del CaCu. Se han elaborado diversas estrategias, entre las cuales está el uso de partículas tipo virus (VLP's) y DNA desnudo. Con este trabajo pretendemos ampliar las perspectivas en el tratamiento del CaCu al proponer un nuevo y seguro modelo de expresión de la proteína E7, que permita inducir inmunidad de tipo celular y humoral.

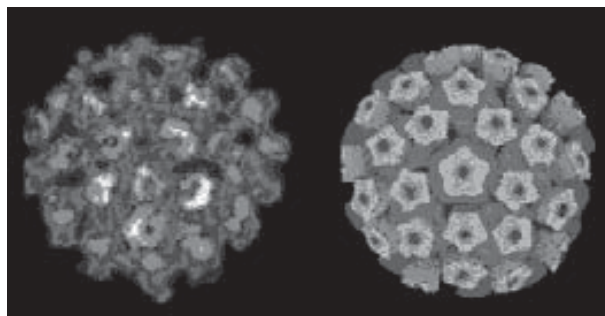
## Metodología

Cepas, plásmidos y medios de cultivos. Las cepas utilizadas en este trabajo fueron: NZ9000 y MG1363 de *Lactococcus lactis* y TG1 de *Escherichia coli*. L.

□ El presente artículo está basado en la investigación «Desarrollo de una vacuna probiótica para el tratamiento del cáncer cérvico-uterino: inducción de una respuesta inmune contra el HPV-16, utilizando una bacteria probiótica», galardonada con el Premio de Investigación UANL 2002 en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre 12 de 2002.

\* Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León, San Nicolás de los Garza, N.L. México. e-mail: rmontesd@ccr.dsi.uanl.mx

\*\* Unité de recherches Laitières et de Genetique Appliquee, INRA, Jouyen Josas Sedex, France



*Lactis* se cultivó en medio M17 (DIFCO), suplementado con 1% de glucosa (GM17) a 30°C sin agitación. *E. coli* se cultivó en medio LB a 37°C con agitación vigorosa. Los plásmidos fueron mantenidos por la adición de los siguientes antibióticos: para *L. lactis*, eritromicina a 5 µg/ml y para *E. coli* ampicilina a 100 µg/ml o eritromicina a 150 µg/ml; cuando estos antibióticos fueron usados simultáneamente, la concentración fue de 75 µg/ml. A menos que se indique lo contrario, todos los plásmidos fueron primero establecidos en *E. coli* y después transferidos a *L. lactis* por electrotransformación.<sup>5</sup> El aislamiento del DNA plasmídico y las manipulaciones del DNA en general se hicieron de acuerdo con protocolos previamente descritos.<sup>5</sup> Las reacciones de PCR fueron hechas con un aparato Perkin-Elmer Cetus (Norwalk, Conn.), usando la Vent DNA Polimerasa. Los productos de PCR fueron confirmados por secuenciación: «Dye-terminator sequencing», usando un aparato Perkin Elmer Cetus (Norwalk, Conn).

Construcción de plásmidos recombinantes. Para la expresión de la proteína E7 sobre la superficie de *L. lactis* el gen E7 del HPV-16 se clonó en fase de lectura con dos diferentes señales; en el extremo 5´ con la señal de secreción de la proteína usp45 de *L. lactis* y en su extremo 3´ con un segmento de la proteína M6 de *Streptococcus pyogenes*, correspondiente a la señal de anclaje a membrana, el cual incluye el motivo LPXTGX.<sup>6</sup>

Para la amplificación del gen E7 se diseñaron los siguientes oligonucleótidos (5´-3´) para dejar en fase de lectura dicho gen en su extremo 5´ con la usp45 y en el extremo 3´ con la señal de anclaje CWA:

E7/*Sal*

(AGTCGACCCATTGCATGGAGATACACCTACATTG)

y E7/*EcoRV* (CGATATCTCTGGTTTCTGAGA ACAGATGGGGCA).

Con estos oligos se amplificó por PCR un segmento de 315 pb del plásmido pCDNA3E7. El

programa del termociclador fue (°C/min): un ciclo a 94/4, 35 ciclos de 94/1, 55/1, 72/1 y un ciclo final de 72/7. El producto de esta reacción se purificó con el estuche Gene Clean II (Promega) y se ligó en el vector pGEM T (Promega). Este plásmido se nombró pGEMT-E7 y con él se transformó la cepa JM109 de *E. coli*.

Clonación de E7 para su expresión regulada mediante el uso de un promotor inducible (*P<sub>nisA</sub>*).<sup>7</sup> El cassette de E7 se liberó con las enzimas *Sal*I y *EcoRV* del pGEMT-E7, se purificó con el sistema Gene Clean II, y se clonó en el vector pVE5547 previamente digerido con las mismas enzimas. Este vector contiene la señal de secreción y la de anclaje, entre las que se fusionó el gen E7.<sup>8</sup> De este vector se obtuvo el cassette usp45-E7-M6 (1200 pb), mediante una digestión con *Bgl*II-*Spe*I y se integró en el plásmido pSEC-E7<sup>4</sup> digerido con las mismas enzimas. De esta manera el cassette usp45-E7-M6 quedó bajo la regulación del promotor (*P<sub>nisA</sub>*). La construcción obtenida (pCWA-E7) se introdujo en la cepa NZ9000 para generar NZCWA-E7.

Extracción de proteínas y Western Blot. La inducción del promotor para la expresión de E7 se realizó por la adición de nisina al medio de cultivo a una concentración de 10 ng/ml de nisina (SIGMA) por un periodo de una hora. Los extractos proteicos y ensayos de Western Blot se realizaron tal y como se describió anteriormente.<sup>4</sup>

Ensayo de inmunofluorescencia. De un preinóculo de la cepa NZCWA-E7, creciendo en GM17 con cloranfenicol, se tomaron 100 µl del cultivo saturados y se inocularon 5 ml de nuevo medio GM17 con cloranfenicol; se dejó en incubación hasta alcanzar una DO600 de 0.4 y se realizó la inducción con 10 ng/ml de nisina por una hora. Se tomaron 2 ml de este cultivo y se recuperaron las células por centrifugación a 5000 rpm / 2 min; la pastilla de células se resuspendió en 1 ml de una solución de PBS con BSA al 3% conteniendo el primer anticuerpo anti-E7 (ED17, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución de 1:500, y se incubó toda la noche a temperatura ambiente con agitación. Al siguiente día se centrifugó en iguales condiciones para retirar el anticuerpo y se hicieron cinco lavados con 500 µl de PBS-Tween 0.05%; posteriormente, las células se incubaron con 100 µl del segundo anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado (Alexa-Fluor) (100 µl de una dilución 1:50 en PBS-BSA 3% del segundo anticuerpo) y se incubó a temperatura ambiente con agitación, toda la noche, en oscuridad. Posterior-

mente se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.05% y, finalmente, las células se resuspendieron en 30  $\mu$ l de PBS. Con 10  $\mu$ l de estas células se realizó un frotis y se fijó por calentamiento directamente a la flama de un mechero. Estas preparaciones se observaron por fluorescencia en un microscopio confocal. Como control negativo se utilizó la cepa silvestre de *L. lactis* (MG1363). Debido a la posibilidad de una reacción inespecífica, se utilizó también un control de la cepa recombinante NZCWA-E7, sin primer anticuerpo (ED17).

**Inmunización.** Grupos de cinco ratones hembras C57BL/6J (5-8 semanas de edad) fueron parcialmente anestesiados con Xilacina vía intramuscular. Se tomaron 20  $\mu$ l ( $1 \times 10^9$  células) de las bacterias de la cepa NZCWA-E7 resuspendidas en PBS con una micropipeta y se aplicaron 10  $\mu$ l en cada nostrilo, gota a gota. De igual manera se inmunizaron ratones con una cepa de *L. lactis* que porta el plásmido pSEC, así como con la cepa MG1363.

**Obtención de suero.** Se obtuvo sangre por vía retroorbital siete días después de la última inmunización y se separó el suero, el cual se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta ser usado.

**Obtención de células espléncicas.** Siete días después de la última inmunización, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Bajo condiciones de esterilidad se obtuvo el bazo para separar las células mononucleares mediante un gradiente de densidad.

**Cultivo de células.** Se utilizaron cajas de cultivo (2 ml), a cada pozo se agregaron  $2 \times 10^6$  células. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: (1) 50  $\mu$ l de Fitohemaglutinina, (2) 50  $\mu$ l de agua estéril y (3) 2  $\mu$ g de péptido E7 (RAHYNIVTF). Se completó a un volumen de 2 ml con medio AIM-V y se dejó 24 horas en incubación a  $37^\circ\text{C}$  con una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5%.

**ELISA.** Se tomó 1.5 ml del cultivo celular y se centrifugó a 5000 rpm/10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$  hasta ser utilizado. La determinación de INF- $\gamma$  e IL-2 se realizó mediante ELISA, utilizando sistemas específicos para estas proteínas murinas (R&D Systems).

## Resultados y discusión

Expresión de la proteína E7 en la superficie de *Lactococcus lactis*

Para analizar la expresión de la proteína E7 anclada

a la pared celular de *L. lactis* (E7-CWA) se realizaron ensayos de Western Blot a partir de extractos totales de la cepa recombinante (figura 1). En el lado izquierdo de la figura se observa la especificidad del anticuerpo al reconocer una proteína E7 producida en *E. coli* (control positivo, GST-E7). En los extractos de *L. lactis* la reacción del anticuerpo contra E7 (figura 1 E7-CWA lado derecho) reveló tres bandas en los extractos celulares: una banda que migra a 38 kDa aproximadamente y que es el tamaño esperado para el precursor  $\text{SP}_{\text{Usp}}\text{-E7-CWA}_{\text{M6}}$ ; y dos bandas de menor peso, una de las cuales corresponde a la forma  $\text{E7-CWA}_{\text{M6}}$  de 32 kDa, que es el resultado del rompimiento de la  $\text{SP}_{\text{Usp}}$ , y la otra, que corresponde a la forma madura  $\text{E7-CWA}$  de 27 kDa producto del procesamiento de la  $\text{CWA}_{\text{M6}}$  (i.e. rompimiento de  $\text{CWA}_{\text{M6}}$  y unión covalente entre la E7 y la pared celular).

Estos resultados muestran que la proteína E7-CWA es eficientemente producida y procesada en *L. lactis*. Puesto que el propósito es el de expresar esta proteína E7 anclada a la pared celular, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para determinar su presencia en la superficie de la cepa recombinante (figura 2). Como se observa en la figura, la reacción con el anticuerpo específico contra E7 y visualizado con un segundo anticuerpo conjugado a Alexa Fluor, resultó positiva en la cepa recombinante de *L. lactis* (figura 2b), pero resultó negativa en la cepa control de *L. lactis* (figura 2a). Este resultado comprueba que, efectivamente, la proteína E7 se encuentra anclada en la superficie de *L. lactis*, y en base al número de células en el frotis

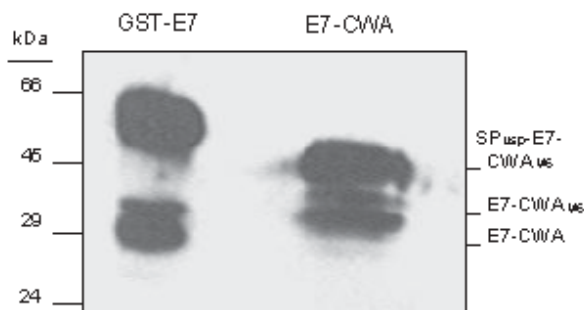


Fig. 1. Expresión de la proteína E7 en *Lactococcus lactis*. Análisis por Western Blot de extractos celulares de cultivos inducidos de la cepa recombinante de *L. lactis*. Se indican las posiciones del precursor ( $\text{SP}_{\text{Usp}}\text{-E7-CWA}_{\text{M6}}$ ), el producto del primer rompimiento ( $\text{E7-CWA}_{\text{M6}}$ ) y la forma madura de la E7 anclada a la pared de *L. lactis* (E7-CWA). A la izquierda se indican las posiciones del marcador de peso molecular.

versus fluorescentes calculamos que aproximadamente un 90% de ellas fueron positivas para la reacción.

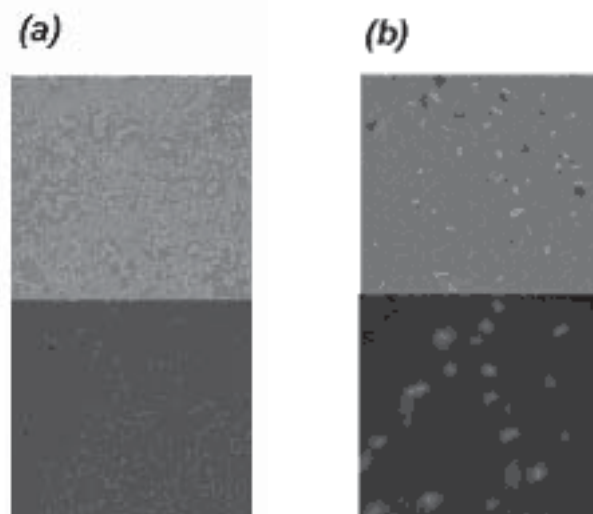


Fig. 2. Detección de E7 en la superficie de *L. lactis* por inmunofluorescencia. Micrografías de inmunofluorescencia de las cepas de *L. lactis* tratadas con anti-E7 y anti-IgG Alexa Fluor: (a) cepa silvestre; (b) cepa recombinante expresando E7 en su superficie. Células fijadas en portaobjetos y visualizadas en un microscopio confocal Olympus Fluoview IX70. Magnificación 100X.

### Inducción de una respuesta inmune humoral

Para determinar la inmunogenicidad de E7 expresado en la superficie de *L. lactis*, se inmunizaron ratones C57BL/6J a los días 1, 14 y 28 (cinco ratones por tratamiento) vía intranasal (i.n). A los 35 días se obtuvo el suero de los animales inmunizados y se utilizó en ensayos de Western Blot para determinar si se había generado una respuesta inmune humoral. En este ensayo se usó como antígeno extractos celulares de *E. coli* que expresan una proteína E7 de fusión (GST-E7), y como primer anticuerpo el suero de los ratones inmunizados, ya sea con la cepa recombinante o con la cepa silvestre de *L. Lactis*. Los resultados muestran que el suero de los ratones inmunizados con la cepa silvestre no reacciona con el antígeno GST-E7 (figura 3A), mientras que el suero de los ratones inmunizados con la cepa recombinante NZCWA-E7 reaccionó claramente con los extractos celulares que contienen la GST-E7 (figura 3B), reconociendo una proteína de peso molecular similar a la reconocida por un anticuerpo monoclonal,

comercial contra E7 (figura 3C). Estos resultados muestran que la proteína E7 del HPV-16 presentada en la superficie de *L. lactis* es inmunogénica.

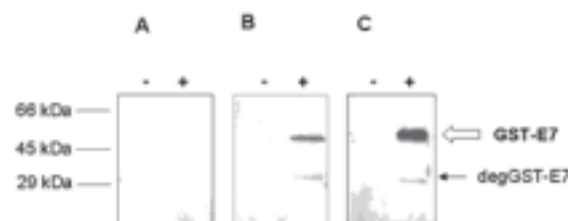


Fig. 3. Detección de anticuerpos anti-E7 por Western Blot en suero de ratones inmunizados con *L. lactis* expresando E7 en su superficie. Extractos de *E. coli* expresando GST-E7 se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS, se transfirieron a membranas PVDF y se incubaron con los sueros de los ratones inmunizados (+). Como control negativo se usó una cepa de *E. coli* que porta solo el plásmido GST (-). A y B fueron incubados con el suero de los ratones inmunizados con las cepas silvestres y la NZCWA-E7, respectivamente. En el panel C la membrana se hibridó con un anti-E7 monoclonal (Santa Cruz, Biotechnology). Las flechas indican la proteína GST-E7 o un producto de degradación de la misma (degGST-E7). Las posiciones del marcador de peso molecular son indicadas a la izquierda.

### Inducción de una respuesta inmune celular

Con el objetivo de determinar el efecto de la administración *i.n.* de la cepa NZCWA-E7 sobre la respuesta inmune de tipo celular, se monitoreó la inducción de dos importantes citocinas relacionadas con este tipo de respuesta: INF- $\gamma$  e IL-2. La gráfica de la figura 4 muestra los resultados de la inducción de IL-2. No se observó una diferencia significativa entre la producción de IL-2 por células de bazo de ratones inmunizados, ya sea con la cepa control o con la cepa recombinante que expresa E7 en su superficie.

Respecto a la inducción de INF- $\gamma$ , se observó un aumento considerable en la producción de esta citocina entre los ratones inmunizados con la cepa control, (NZ9000 portando el vector pSEC) y en los que fueron inmunizados con la cepa productora de E7 (figura 5). Esto indica que la cepa recombinante construida es capaz de inducir la producción de INF- $\gamma$  cuando es administrada vía *i.n.*

Para determinar el grado de inmunogenicidad de la oncoproteína E7 expresada en la superficie de *L. lactis* y dado que existen reportes de que esta

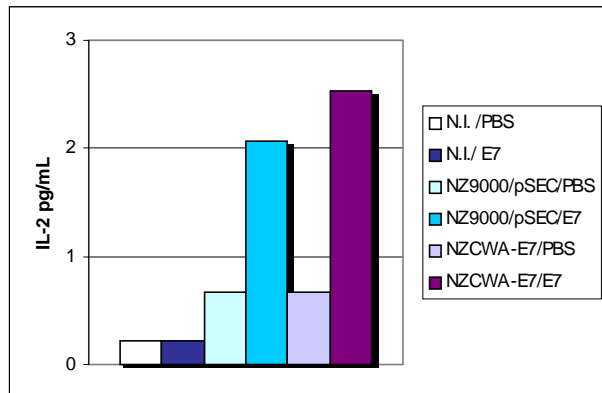


Fig. 4. Inducción de IL-2 por *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie. Células de bazo de ratones sin inmunizar (NI); inmunizados con un *L. lactis* portando el plásmido pSEC (NZ9000/pSEC) y con la cepa N.ZCWA-E7 fueron reestimuladas *in vitro* con solución salina (PBS) o con un péptido sintético de E7.

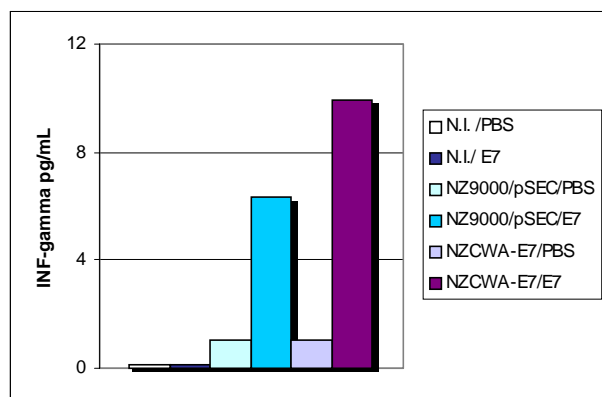


Fig. 5. Inducción de INF- $\gamma$  por *Lactococcus lactis* expresando E7 en su superficie. Células de bazo de ratones sin inmunizar (NI), inmunizados con un *L. lactis* portando el plásmido pSEC (NZ9000/pSEC) y con la cepa N.ZCWA-E7, fueron reestimuladas *in vitro* con solución salina (PBS) o con un péptido sintético de E7.

forma es más inmunogénica que una forma de citoplasma o de secreción, se comparó la inducción de INF- $\gamma$  (por ser el que más aumentó en los ensayos anteriores) entre la cepa construida y dos cepas de *L. lactis* reportadas anteriormente y que expresan la oncoproteína E7 en citoplasma y secretada al medio de cultivo.<sup>4</sup> Los resultados obtenidos (figura 6) muestran que efectivamente nuestra cepa es ~5 veces más inmunogénica que las otras dos.

Este trabajo demuestra el potencial de una bacteria ácido-láctica probiótica para su uso como un nuevo vector vivo para el desarrollo de una vacuna terapéutica contra el CaCu. Previamente reportamos

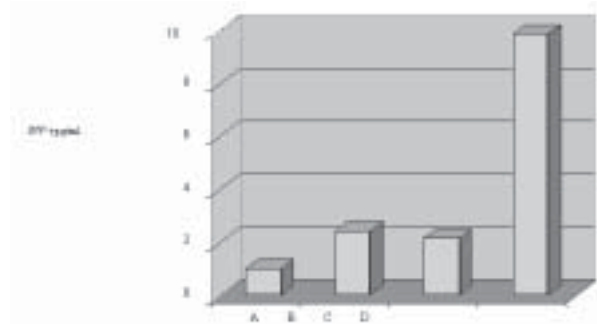


Fig. 6. Inducción de INF- $\gamma$  por *Lactococcus lactis* expresando E7 en diferentes localizaciones celulares. Células de bazo de ratones inmunizados con la cepa *L. lactis* portando el plásmido pSEC(A) y con las diferentes cepas recombinantes expresando E7 en citoplasma (B), secretada (C) y en la pared celular (D). Se estimularon *in vitro* con un péptido sintético de E7.

la producción de E7 en *L. lactis*. En dicho trabajo se encontró que E7 es extremadamente lábil y que es degradada en el citoplasma de *L. lactis*. Es interesante advertir que la producción de E7 puede rescatarse cuando ésta es fusionada a una proteína altamente estable a la desnaturalización, la nucleasa Staphylococcal (Nuc). En este trabajo encontramos que la fusión E7-CWA tiene efectos similares en la estabilización de E7 en *L. lactis*. Además *L. lactis* presenta la ventaja de que es un microorganismo totalmente inocuo y no persistente y, por tanto, constituye un vector seguro para propósitos de vacunación. Finalmente, las bacterias ácido-lácticas pueden ser administradas a través de las mucosas, lo cual, aunado a que pueden ser almacenadas por largos tiempos, disminuye los costos de producción y facilita su distribución, especialmente en países en vías de desarrollo, como México.

## Resumen

Dado que el virus del papiloma humano tipo 16 (HPV-16) es la principal causa del cáncer cérvicouterino, hay una gran necesidad de desarrollar una vacuna profiláctica y/o terapéutica. La oncoproteína E7 es constitutivamente producida por neoplasias cervicales y, por tanto, considerada como un blanco potencial para dirigir el desarrollo de una vacuna terapéutica contra el cáncer cérvico-uterino. En este trabajo desarrollamos un sistema inducible para expresar la proteína E7 del HPV-16 en la superficie de la bacteria

*Lactococcus lactis*. Los resultados obtenidos muestran que *L. lactis* es capaz de presentar E7 en su superficie. Además, la administración intranasal de esta cepa recombinante en ratones induce una respuesta inmune específica de antígeno. Esta es la primera vez que se reporta el anclaje de la proteína E7 en la superficie de una bacteria ácido láctica grado-alimenticio. Esto es de gran interés, ya que representa una nueva vía de expresión de E7 y un avance en el desarrollo futuro de una vacuna terapéutica nasal y/o oral contra el CaCu usando vectores seguros.

Palabras claves: *Lactococcus lactis*, E7, Cáncer, HPV, Vacunas.

#### Abstract

Since human papillomavirus type 16 (HPV-16) is the major cause of cervical cancer (CaCu), there is a need for the development of prophylactic and/or therapeutic HPV vaccines against this neoplasia. E7 viral oncoprotein is constitutively produced in cervical neoplasia and is considered as a suitable target for the development of therapeutic vaccine against CaCu. In this work, we developed an inducible system to anchor the E7 protein at the cell surface of *Lactococcus lactis*, a food grade and non invasive Gram positive bacterium. Our results indicate that *L. lactis* is able to display E7 at its cell surface. Furthermore, after intranasal administration of these recombinant lactococci, an HPV-16 E7-specific immune response was induced. This is the first report of E7 surface anchoring in a food-grade lactic acid bacterium. This is of particular interest since it is a new and efficient way to deliver E7 and it represents one more step towards the development of therapeutic nasal and/or oral vaccine against CaCu using safe delivery systems.

Keywords: *Lactococcus lactis*, E7, Cancer, HPV, Vaccine.

#### Referencias

1. Escandón-Romero, Benítez-Martínez M.G., Navarrete-Espinoza J., Vázquez M., Martínez-Monteñes O.G., Escobedo de la Peña J. Epidemiología del cáncer cervicouterino en el Instituto Mexicano del Seguro Social. *Salud Pública México*. (1992) 40, 38-46.
2. Guzmán-Rojas L., Alcocer-González J.M., & Madrid-Marina V. Perspectivas para el desarrollo de vacunas e inmunoterapia contra cáncer cervicouterino. *Salud Pública México*. (1998) 40, 38-46.
3. Muñoz N., Bosch F.X. Cervical cancer and human papillomavirus: epidemiological evidence and perspectives for prevention. *Salud Pública México*. (1997) 39, 274-282.
4. Bermúdez-Humarán L.G., Langella P., Miyoshi A., Gruss A., Tamez-Reyes R.S., Montes de Oca-Luna R., Le Loir Y. Production of Human Papillomavirus Type 16 E7 Protein in *Lactococcus lactis*. *Applied Environmental Microbiology*. (2002) 68, 917-922.
5. Sambrook J, Fritsch EF, & Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
6. Piard J.C., Jiménez-Díaz R., Ehrlich S.D., Fischetti, V.A., Gruss A. The M6 protein of *Streptococcus pyogenes* and its potential as a tool to anchor biologically active molecules at the surface of lactic acid bacteria. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. (1997) 418, 545-550.
7. de Ruyter P.G., Kuipers O.P., de Vos W.M. Controlled gene expression systems for *Lactococcus lactis* with the food-grade inducer nisin. *Applied and Environmental Microbiology*. (1996) 62, 3662-3667.
8. Dieye Y., Usai S., Clier F., Gruss A., Piard J.C. Design of a protein targeting system for lactic acid bacteria. *Journal. Bacteriology*. (2001) 183, 4157-4166.