Determinación de la inmunogenicidad y caracterización de una proteína quimérica como candidato vacunal contra SARS-CoV-2

Rivera Ballesteros Juan Carlos[1], Mosqueda Gualito Juan Joel[1], Hernández Silva Diego Josimar[1]

[1] Laboratorio de Inmunología y Vacunas, Unidad de Microbiología Básica y Aplicada, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Autónoma de Querétaro

INTRODUCCIÓN

El SARS-CoV-2 es el virus causante de la enfermedad de COVID-19 (WHO, 2022). El brote de SARS-CoV-2 ocurrido el año 2019 en la región de Wuhan, China eventualmente condujo al desencadenamiento de una pandemia que ha ocasionado hasta la fecha mas de 6 millones de muertes (WHO, 2022).

El objetivo de este trabajo es evaluar la seguridad e inmunogenicidad de la proteína QUIVAX 17.4, una proteína quimérica multiepitópica diseñada mediante bioinformática. La proteína contiene en su diseño 6 epítopos del dominio de
unión a receptor (RBD) de la glicoproteína S del SARS-CoV-2.

Con el uso de esta vacuna quimérica se pretende generar anticuerpos contra dicho dominio para que interaccionen con el dominio RBD y así, bloquear la unión entre la proteína S con ACE2, el receptor celular que utiliza para entrar y replicarse dentro de las células.

Por otro lado, con anticuerpos obtenidos mediante inmunizaciones con péptidos sintéticos, se busca confrimar que la proteína contenga al menos 4 de los 6 epítopos con los que fue diseñada.

La finalidad de este trabajo fue: generar información que permita determinar si la proteína quimeríca, si posee los péptidos con los que fue diseñada y si genera alguna reacción adversa.

METODOLOGÍA

A. Producción de la E. coli capaz de producir la proteína quimérica en condiciones controladas en un biorreactor Sartorius BIOSTAT A.

B. Lisis de la biomasa.

C. Purificación medainte Cromatografia de afinidad a iones metálicos y diálisi de la proteína.

D. Emulsificación de las dosis vacunales:

D1. Dosis con PBS + Montanide ISA VG 71 + proteína quimérica (100, 60 y 30 microgramos)

D2. Dosis con PBS + Montanide ISA VG 71 + péptidos sintéticos 3, 4, 5 y 6 (100 microgramos)

D3. Dosis con PBS + Montanide ISA VG 71 (Grupo Control)

E. Administración de dosis y obtención de muestras de sangre en conejos.

F. Medición de parámetros para determianr efectos adversos:

F1. Temperatura

F2. Inflamación de nódulos linfáticos.

F3. Granulomas en el sitio de administración de la dosis.

G. Ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para la detección de anticuerpos anti-proteína QUIVAX 17.4.

H. Electro transferencia de proteínas (Western Blot) para la detección de anticuerpos anti epítopos de la proteína QUIVAX 17.4.

I. Análisis de las ELISAS mediante prueba de t para muestras no pareadas.

RESULTADOS

Dosis	Conejo	Dosis	Conejo
P3 (100 µg)	C1	Proteina (100 µg)	C11
	C2		C12
P4 (100 µg)	C3		C20
	C4	Proteina (60 µg)	C14
P5 (100 µg)	C5		C15
	C6		C16
P6 (100 µg)	C7	Proteina (30 µg)	C17
	C8		C18
Adyuvante	C9		C19

Tabla 1. Nomenclartura de los conejos. En esta tabla se muestran como fueron identificados los conejos, el componente que se les fue inoculado y en qué cantidad. Los colores denotan agrupaiento de individuos inmunizados con el mismo componente.

Dosis	Conejo	Segunda inmunización		
		Pre	24H	48H
P3 (100 µg)	C1	menor a 1mm	S/G	S/G
	C2	menor a 1mm	menor a 1mm	menor a 1mm
P4 (100 µg)	C3	S/G	S/G	S/G
	C4	S/G	0.4cm x 0.7cm	S/G
P5 (100 µg)	C5	S/G	S/G	S/G
	C6	S/G	S/G	S/G
P6 (100 µg)	C7	S/G	0.5cm x 0.8cm	0.4cm x 0.5cm
	C8	S/G	S/G	S/G
Adyuvante	C9	S/G	S/G	S/G
Proteina (100 µg)	C11	S/G	0.6cm x 1cm	0.8cm x 0.9cm
	C12	S/G	S/G	S/G
	C20	S/G	0.6cm x 1.2cm	0.5cm x 0.5cm
Proteina (60 µg)	C14	S/G	S/G	S/G
	C15	S/G	0.5cm x 0.6cm	0.4cm x 0.6cm
	C16	0.7cm x 0.5cm	0.8cm x 0.7cm	0.3cm x 0.3cm
Proteina (30 µg)	C17	S/G	S/G	S/G
	C18	S/G	S/G	S/G
	C19	S/G	0.6cm x 0.8cm	0.3cm x 0.4cm

Tabla 2.Granulomas en el sitio de inyección. En esta tabla se muestran las dimensiones de los granulomas en los conejos. Si no hay granuloma la celda denota S/G.

Dosis	Conejo	Segunda inmunización		
		Pre	24H	48H
P3 (100 µg)	C1	OK	OK	OK
	C2	OK	OK	OK
P4 (100 µg)	C3	OK	OK	OK
	C4	OK	OK	OK
P5 (100 µg)	C5	OK	OK	OK
	C6	OK	OK	OK
P6 (100 µg)	C7	OK	I y D	OK
	C8	OK	I	OK
Adyuvante	C9	OK	OK	OK
Proteina (100 µg)	C11	OK	OK	OK
	C12	OK	I	OK
	C20	OK	OK	OK
Proteina (60 µg)	C14	OK	OK	OK
	C15	OK	I y D	OK
	C16	OK	I y D	OK
Proteina (30 µg)	C17	OK	OK	OK
	C18	OK	OK	OK
	C19	OK	OK	OK

Tabla 3. Inflamación en los nódulos preescapulares. Los OK denotan que no hubo inflamación, la letra D es inflamación en linfonodo Derecho, la I denota inflamación en linfonodo Izquierdo ; mientras que la I y D denotan inflamación en ambos linfonodos.

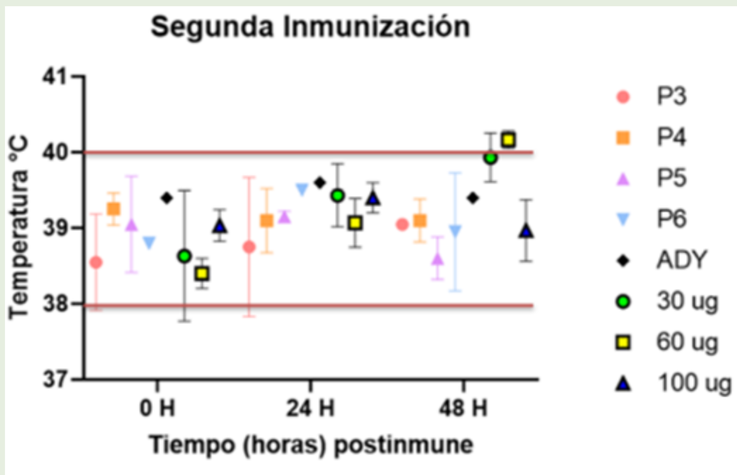

Figura 1. Temperaturas de los grupos de conejos. En la figura se ilustran el promedio de las temperaturas medidas por grupo. Las líneas rojas delimitan lrel rango de temperatura promedio en conejos.

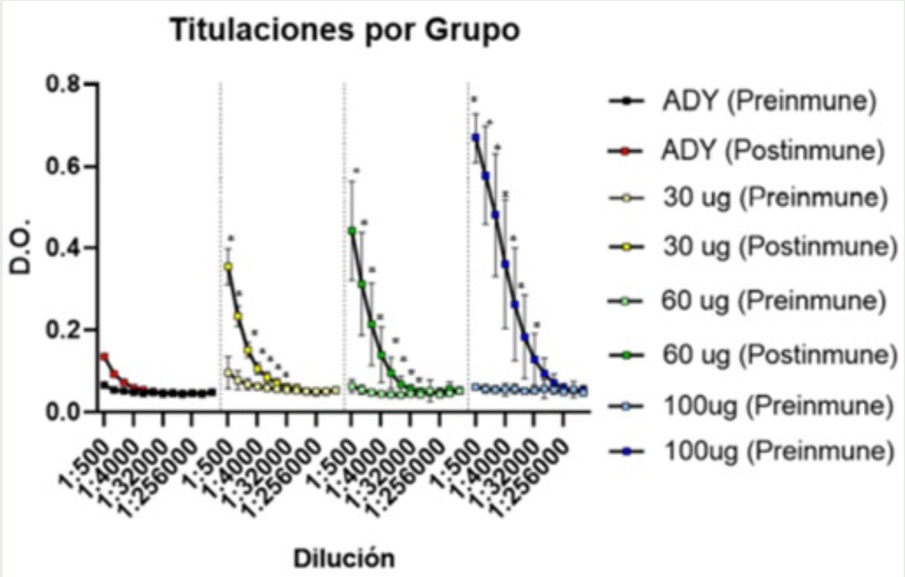

Figura 2. Títulos de anticuerpos por grupos. En la gráfica se muestran los títulos de anticuerpos por grupos. Las ELISAS se hicieron únicamente con sueros de conejos de los grupos control e inmunizados con 30, 60 y 100 microgramos de proteína QUIVAX 17.4. Los asteriscos denotan diferencia estadísticamente significativa entre el suero pre y post inmune.

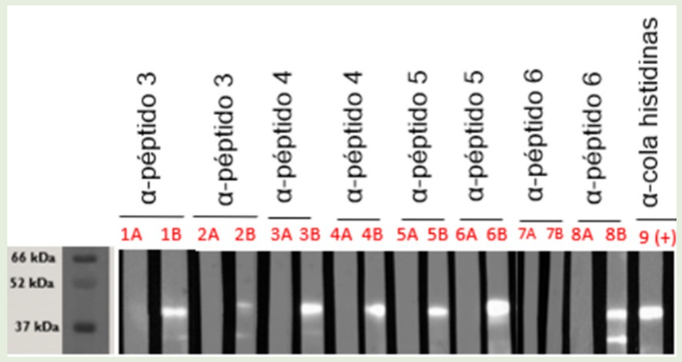

Figura 3. Inmunodetección de la proteína mediante Western Blot. En la imagen se ulistra la proteína QUIVAX17.4 transferida a una membrana de nitrocelulosa sometida a diferentes tratamientos. Los números en rojo denotan un conejo, la letra A denota suero preinmune y la letra B denota suero post inmune.

CONCLUSIONES

1) La proteína quimérica estimula el sistema inmune de los conejos ya que produce anticuerpos capaces de reconocer a la proteína quimérica.

2) La proteína contiene los epítopos 3-6 con los que fue diseñada.

3) La proteína no desencadena efectos adversos en los lepóridos a los que se les administró.

Created with BioRender Poster Builder