

Enfoque inmunoinformático para diseñar una nueva vacuna oral basada en epítomos contra *Helicobacter pylori*.

Victor Urrutia-Baca^{a*}, Ricardo Gomez-Flores^a, Myriam De la Garza-Ramos^b, Patricia Tamez-Guerra^a y Daniela Lucio-Sauceda^a.

^a Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Pedro de Alba S/N, Cd. Universitaria, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

^b Unidad de Odontología Integral y Especialidades (UOIE), Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), Universidad Autónoma de Nuevo León. Av. Dr. Aguirre Pequeño y Silao S/N. Col. Mitras Centro Monterrey, Nuevo León, México.

*vurrutia1990@gmail.com

Palabras clave: vacuna oral, multi-epitopo, prevención, *in silico*.

Introducción

Helicobacter pylori es un agente infeccioso que coloniza la mucosa gástrica de la mitad de la población mundial. Esta bacteria ha sido reconocida como carcinógeno perteneciente al grupo 1 por la OMS por su papel en el desarrollo de gastritis, úlceras pépticas y cáncer¹⁻². Debido al aumento de la resistencia a los antibióticos utilizados en la terapia convencional anti-*H. pylori*, el desarrollo de una vacuna eficaz es una alternativa de gran interés, que sigue siendo un desafío³. Por lo tanto, es necesario un diseño de vacuna racional, estratégico y eficiente contra *H. pylori* donde el uso de las herramientas bioinformáticas más actuales pueda ayudar a lograrlo⁴. En este estudio, se empleó un enfoque de inmunoinformático para diseñar una nueva vacuna oral multi-epitopo contra *H. pylori*.

Metodología

Se realizó un análisis de predicción de epítomos inmunogénicos de células B y T de once proteínas de *H. pylori* en base a su afinidad con los diferentes alelos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) para humano y ratón mediante herramientas bio e inmunoinformáticas. Se utilizaron los algoritmos de VaccineCAD (EpiVax Inc., RI, EE. UU.) y EpiToolKit 2.0 para optimizar el orden de los epítomos y diseño de la vacuna. Además, se añadieron secuencias espaciadoras Gly-Pro-Gly-Pro-Gly (GPGPG) y Lys-Lys (KK) entre cada epítopo. Las secuencias de la subunidad B de toxina del cólera (CTB) y CKS9 (péptido de localización de células M) se agregaron al modelo de vacuna en los extremos N- y C-terminal, respectivamente. Posteriormente, la estructura secundaria del antígeno multi-epitopo se predijo usando PSIPRED v3.3. El modelado de la estructura en 3D se realizó utilizando el servidor I-TASSER y posteriormente el modelo de mayor calidad fue refinado. Se evaluó la antigenicidad, alergenicidad, solubilidad y características fisicoquímicas de la vacuna.

Por último, la secuencia de DNA codificante fue sintetizada y clonada en el vector lanzadera *E. coli-L. lactis* pNZ8048. La construcción final fue transformada en *L. lactis* NZ900 mediante electroporación. Se seleccionaron las clonas recombinantes y la expresión proteica se confirmó por SDS-PAGE y *Western Blot*.

Resultados y discusión

Nuestra vacuna multi-epitopo está compuesta por CTB que se usa como adyuvante de la mucosa para mejorar la inmunogenicidad oral. CTB fusionado con once epítomos

predichos de proteínas de *H. pylori* relacionada a los mecanismos patogénicos (UreB₁₇₀₋₁₈₉, VacA₄₅₉₋₄₇₈, CagA₁₁₀₃₋₁₁₂₂, GGT₁₀₆₋₁₂₆, NapA₃₀₋₄₄ y OipA₂₁₁₋₂₃₀) y colonización (HpaA₃₃₋₅₂, FlaA₄₈₇₋₅₀₆, FecA₄₃₇₋₄₅₆, BabA₁₂₉₋₁₄₉ y SabA₅₄₀₋₅₅₉) proteínas (tabla 1). Un péptido CKS9 (CKSTHPLSC), que dirige la vacuna hacia las células epiteliales de micropliegue para mejorar su absorción intestinal (Figura 1).

La vacuna está compuesta por 373 aminoácidos y la predicción de la estructura secundaria mostró que contiene un 35% de hélices alfa, un 14,0% de láminas beta y un 49,0% de otras estructuras (bobina aleatoria y giro beta). Nuestros resultados indicaron que la calidad y la estabilidad del modelo 3D refinado final se mejoraron notablemente en base a las predicciones Ramachandran (Figura 2).

Se obtuvo una puntuación de antigenicidad de 0.5547. La predicción de alergenicidad, demostró que la vacuna no es alérgica. El peso molecular y el pI teórico de la proteína fueron 40.7 kDa y 9.36, respectivamente. La solubilidad en la sobreexpresión en *E. coli* fue de 0.821589. La vida media se estimó en 30 h en los reticulocitos de mamíferos, >20 h en levadura y >10 h en *E. coli*. La vacuna fue catalogada como estable con un índice de inestabilidad (II) de 32.58. Los valores de GRAVY e índice alifático fueron -0.485 y 67.77, respectivamente. Por otro lado, se introdujeron los sitios de restricción NcoI y HindIII para su clonación en pNZ8084 para formar una construcción plasmática de 4,566 bp, que fue confirmada por PCR y secuenciación (Figura 3).

Se observó una banda de un peso aproximado de ~40 kDa en SDS-Page y *Western blot* tras la inducción con 10 ng/mL de nisina durante 5 h a 37°C en condiciones anaerobias (Figura 4).

Conclusiones

Nuestro nuevo diseño de vacuna oral podría ser un buen candidato contra *H. pylori*. Sin embargo, para validar los efectos profilácticos y terapéuticos de nuestro diseño de vacuna oral, se requieren estudios inmunológicos *in vitro* e *in vivo*.

Referencias

1. Marshall, B.J.; Warren, J.R. *Lancet*. 1984, 1, 1311-1315.
2. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 1994, 61, 1-241.
3. Sutton, P.; Boag, J.M. *Vaccine*. 2018, 37, 2221-2230.
4. Rappuoli, R.; Bottomley, M.J.; D'Oro, U.; et al. *J. Exp. Med.* 2016, 213, 469-481.