



Departamento de Desarrollo Biotecnológico
Instituto de Higiene, Facultad de Medicina
UdelaR



MONOGRAFÍA DE METODOLOGÍA CIENTÍFICA II

GRUPO N°57

SEPTIEMBRE 2014

***“Aplicación de nuevas tecnologías para el diseño
racional de vacunas”***

Br. José Alvite
Br. Cristian Campos
Br. Luciana Puglia
Br. Roberto Ratner

Orientador: MSc. Andrea Rossi

ÍNDICE

Resumen _____	Pág. 3
Fundamentación _____	Pág. 4
Introducción _____	Pág. 5
1. Vacunas humanas _____	Pág. 5
2. Aplicación de nuevas tecnologías aplicadas al desarrollo de vacunas _____	Pág. 6
3. <i>Neisseria Meningitidis</i> _____	Pág. 9
Objetivo General _____	Pág. 12
Metodología _____	Pág. 12
Resultados _____	Pág. 13
1. Vacunas meningocócicas _____	Pág. 13
2. Diseño racional de una vacuna contra el serotipo MenB _____	Pág. 14
3. Cobertura Vacunal _____	Pág. 21
Conclusiones y Perspectivas _____	Pág. 24
Referencias Bibliográficas _____	Pág. 25

RESUMEN

Las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema en nuestro medio. El tradicional método de desarrollo de vacunas en forma empírica ha permitido superar ciertos obstáculos pero no los suficientes, llevando a la necesidad de contar con nuevas y más eficaces vacunas. En los últimos años la generación de conocimientos en diversas áreas como la salud, ciencias básicas y tecnológicas ha permitido el diseño racional de vacunas. Dentro del área tecnológica se destacan en particular la genómica y proteómica.

El objetivo de esta monografía ha sido revisar los datos sobre la aplicación de vacunas tradicionales y el avance de la tecnología aplicada al desarrollo de nuevas vacunas. En particular el estudio se centra en la nueva vacuna contra *Neisseria meningitidis* serotipo B creada mediante vacunología reversa. La nueva vacuna llamada 4CMenB (*Bexsero*®) atravesó las distintas etapas clínicas y fue aprobada por la Agencia de Medicina Europea (EMA). Los ensayos clínicos demuestran que la vacuna es inmunógena y segura en lactantes, niños, adolescentes y adultos, e induce memoria inmunológica. A la fecha más de 6400 personas en estudios clínicos recibieron la vacuna 4CMenB. Más de 4800 eran niños y 1600 adolescentes y adultos. Los estudios también se realizaron en otras áreas geográficas como Europa, Sudamérica y Norteamérica.

Palabras Claves: vacunas humanas, *Neisseria meningitidis* subtipo B, vacunología reversa, vacuna 4CMenB.

FUNDAMENTACIÓN DE LA PROPUESTA

La aplicación masiva de vacunas, en su mayoría desarrolladas en forma empírica, bajo métodos tradicionales basados en los principios de Pasteur (aislar, inactivar e inyectar el agente causal de enfermedad) ha tenido un enorme impacto en salud, aumentando la expectativa de vida. Sin embargo, las enfermedades infecciosas siguen siendo un problema, en particular porque algunos patógenos presentan una alta capacidad de evasión, los anticuerpos no son suficientes para la protección, dado que se requiere de la respuesta inmune humoral y celular.

Este contexto, ha llevado a la necesidad contar con nuevas y más eficaces vacunas, y en estos últimos años se ha producido un gran avance en este sentido. La generación de conocimientos en diversas áreas como la salud, ciencias básicas y tecnológicas ha permitido el diseño racional de vacunas. Dentro del área tecnológica se destacan en particular la genómica y proteómica que permiten identificar nuevos antígenos; el diseño computacional que define antígenos y epítopes protectores; así como la síntesis *in vitro* que permite la aceleración en la producción de vacunas y la incorporación de nuevos y adecuados adyuvantes e inmunopotenciadores, contribuyendo de esta manera a mejorar su seguridad y eficacia.

En particular nuestra monografía se centrará en el diseño de la nueva vacuna contra *Neisseria meningitidis* serotipo B. La vacuna actualmente disponible carece de una protección uniforme contra las distintas afecciones que produce el patógeno por lo que recientemente se ha desarrollado y aprobado una vacuna que se ha diseñado mediante la aplicación de biotecnología moderna.

INTRODUCCIÓN

1. Vacunas humanas

La utilización masiva de vacunas, en su mayoría desarrolladas empíricamente, ha tenido un enorme impacto en salud humana reduciendo la incidencia de enfermedades infecciosas y muertes, hecho que sólo ha sido superado por la disponibilidad de agua potable.

Los primeros datos sobre la vacunación datan del siglo VII, cuando budistas indios se inmunizaban ingiriendo veneno de serpiente, reportes del siglo X indican que en el imperio chino se inoculaba el virus de la viruela de manera de prevenir la enfermedad¹. A fines del siglo XVII, más precisamente en 1796 el médico inglés Eduard Jenner marcó una nueva etapa en el desarrollo de vacunas, inoculando el virus de viruela proveniente del ganado bovino (virus vivo atenuado) a humanos y logrando la prevención de la enfermedad (*variolización*). En 1885, Louis Pasteur perfeccionó los métodos de desarrollo de vacunas mediante la primera vacuna antirrábica humana². Pasteur descubrió que luego de varios pasajes de patógenos a través de medios de cultivo, o en el caso de la rabia, a través de médula espinal de conejos, generaba un agente infeccioso menos virulento pero que conservaba la capacidad de inducir respuesta inmune efectiva frente al desafío con la cepa virulenta³. Las experiencias realizadas por Pasteur establecieron los principios de aislamiento, inactivación y administración de patógenos causantes de enfermedad para el desarrollo de vacunas. A lo largo del siglo 20, estas vacunas de "primera generación", que constan de patógenos vivos, atenuados o muertos, han sido ampliamente utilizadas contra varios agentes causantes de enfermedades (por ejemplo, poliomielitis, rabia, viruela)⁴.

En la segunda mitad del siglo veinte, la necesidad de producción a gran escala de agentes patógenos y el riesgo de reversión a la virulencia impulsaron el desarrollo de nuevas tecnologías que llevaron al desarrollo de vacunas de "segunda generación". Dichas vacunas están conformadas por subunidades o fracciones de patógenos purificados y ejemplos de éstas son las vacunas contra tétanos, difteria, ántrax, neumonía, gripe, hepatitis B, enfermedad de

Lyme y en el 1979 se erradicó la viruela gracias a la aplicación de una campaña masiva de vacunación⁵. Con este tipo de vacunas a subunidad construidas sobre la base de las macromoléculas nativas de patógenos, se imita la exposición específica de un patógeno con el fin de activar el sistema inmune del huésped para generar una respuesta inmune de memoria que proteja contra la futura infección mediante la incorporación de antígenos específicos. Sin embargo, el desarrollo de vacunas de subunidades requiere estrategias para identificar posibles antígenos capaces de provocar una inmunidad protectora. Los enfoques convencionales para la identificación de antígenos suelen comenzar con el cultivo del patógeno diana en condiciones de laboratorio, luego se evalúa la inmunogenicidad de los componentes proteicos *in vitro* e *in vivo*, lo que conduce en última instancia a la identificación de un subconjunto de proteínas asociado con la inmunidad protectora. Sin embargo, no todos los patógenos puede ser cultivados fuera del organismo huésped, muchas proteínas son expresadas sólo transitoriamente durante el curso de la infección, y no todas las proteínas son lo suficientemente abundantes para ser detectadas por ensayos *in vitro*⁶.

2. Aplicación de nuevas tecnologías para el diseño racional de vacunas

Las vacunas de “segunda generación” no han sido capaces de inducir una amplia inmunidad protectora contra ciertos patógenos como son aquellos con una antigenicidad hipervariable (ejemplo *N. meningitidis* serotipo B, HIV y virus de la hepatitis C) o contra patógenos con fases intracelulares causantes de infecciones controladas predominantemente por células T como la tuberculosis y la malaria. Además, los procesos de desarrollo tradicionales de estas vacunas son muy lentos no permitiendo una rápida respuesta en el caso de necesitar una nueva vacuna como ocurrió en el caso de la pandemia de influenza. Para sortear estas limitaciones, durante los últimos 30 años, gracias a los avances que se han dado en diversos campos, tanto tecnológicos como científicos, han comenzado a aplicarse nuevas técnicas para el desarrollo racional de vacunas. Plataformas como el ADN recombinante, el desarrollo de

la química de carbohidratos, y más recientemente la vacunología reversa y estructural como las vacunas a ARN sintético han abierto las posibilidades de diseñar y desarrollar vacunas de “tercera generación”⁷.

La primera aproximación al desarrollo racional de vacunas fue establecida por Stephen Johnston y colaboradores, esta primera aproximación se desarrollaba principalmente inmunizando con una librería de expresión completa de un patógeno para simular una vacuna a organismo entero sin el riesgo de que el patógeno se vuelva virulento lo cual aumentaba las chances de crear una vacuna con múltiples partes sin tener un conocimiento completo de la biología del patógeno⁸. Este tipo de procedimientos ha ido en avance con la finalidad de identificar antígenos protectivos, dentro de estas técnicas encontramos la genómica, la proteómica, la transcriptómica y la genómica comparativa (Fig. 1)

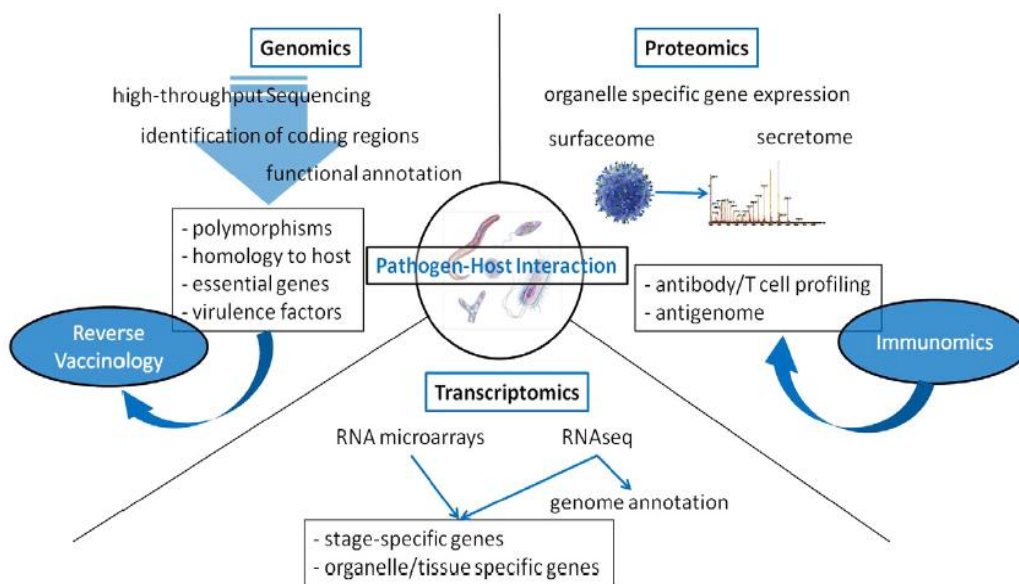


Figura 1. Esquema de varias técnicas ómicas y su influencia en el desarrollo de vacunas de “tercera generación”. La secuenciación de alto rendimiento y los avances de la biología molecular, citometría, la bioinformática y tecnologías relacionadas han facilitado la elucidación de genomas de patógenos y la identificación de nuevos genes y sus productos proteicos y han dado lugar a un enfoque de “gen a vacuna” para el desarrollo de vacunas. Los estudios proteómicos y transcriptómicos informan la biología de patógenos y definen subconjuntos de antígenos, y proteínas específicas de cada etapa de la vida del patógeno para un desarrollo más racional de vacunas. Junto con un aumento del conocimiento de la respuesta inmunitaria del huésped de protección, el proteoma se puede examinar para encontrar un posible candidato vacunal utilizando estudios basados en técnicas inmunómicas. Tomado de Schussek et al, 2014⁹.

En las técnicas genómicas el objetivo es detectar posibles genes que codifiquen antígenos protectivos. Como primer paso, se comienza con el análisis del material genético del patógeno, se busca dentro del genoma posibles regiones codificantes de proteínas, y se trata de establecer la función de las proteínas a través del análisis de secuencias homólogas y de genética reversa para descubrir el repertorio completo de proteínas del agente. Para esto se utilizan distintas herramientas, para la decodificación del genoma se utilizan técnicas como el análisis *in silico* del material genético del agente en estudio, microarreglos de ADN o ARN, secuenciación de ADN y ARN, para el establecimiento de la función de las proteínas se utilizan otras técnicas como la espectrometría de masa; siguiendo esta línea, se puede lograr a través del conocimiento de la secuencia de ADN, mutar genes de interés para identificar proteínas esenciales para el patógeno, técnica denominada “genética reversa”¹⁰.

La vacunología reversa consiste en el análisis *in silico* del genoma del patógeno con programas bioinformáticos para identificar regiones que, debido a sus funciones en la biología del microorganismo, puedan ser candidatos a ser utilizados en una vacuna. Tras la selección se prueban posibles vacunas en modelos animales para luego confeccionar una vacuna definitiva. Esta técnica es la que se ha aplicado para el desarrollo de la vacuna objetivo de nuestro trabajo (*Bexsero*®). Los pioneros desarrollarla han sido Rappuoli y colegas¹¹.

La transcriptómica se basa en ver el perfil de expresión de ARN mensajero durante las distintas fases de la infección o frente a distintos nutrientes que se encuentren dentro del huésped. Es la plataforma que se ha utilizado más ampliamente para identificar los distintos grupos de genes implicados en la patogénesis y que puedan llegar a representar posibles blancos inmunitarios son los microarreglos de ADN o ARN y más recientemente se ha introducido la secuenciación del ARN (RNAseq)¹².

La proteómica podría llegar a ser más ventajosa que la técnica transcriptómica, dado que la expresión de un gen no se correlaciona necesariamente con la expresión de una proteína. Diversos métodos de análisis se utilizan para llevar

adelante esta técnica como son la resonancia magnética, espectrometría de masas, así como procedimientos de fraccionamiento celular y desarrollo de software analítico especializado¹³.

La inmunómica utiliza muestras biológicas de un huésped con inmunidad frente a una enfermedad de interés para definir un *inmunoma* del patógeno. La inmunómica es un sistema biológico basado en un acercamiento que estudia la interfase entre el sistema inmune del huésped y el proteoma del patógeno mediante técnicas informáticas, genómicas, proteómicas, inmunológicas y de medicina clínica. Dentro de esta técnica encontramos dos estrategias, una es la búsqueda de antígenos utilizando microarray de proteínas y suero hiperinmune; la otra línea de trabajo se centra en la detección de antígenos reconocidos por linfocitos T, en los cuales se utilizan algoritmos informáticos para detectar posibles epítomos con mayor o menor afinidad al complejo mayor de histocompatibilidad¹⁴.

Uno de los principales ejemplos del desarrollo racional de nuevas vacunas mediante la aplicación de nuevas tecnologías el desarrollo de vacunas contra la enfermedad meningocócica invasiva y en su principal patógeno *N. meningitidis* serotipo B. En tal sentido nuestra revisión bibliográfica se centrará en el desarrollo de la nueva vacuna contra este patógeno de importancia mundial.

3. *Neisseria meningitidis*

La enfermedad meningocócica es causada por una variedad de bacterias y/o virus, pero su principal agente etiológico es la *N. meningitidis*, bacteria intracelular, capsulada, diplococo, Gram negativa, oxidasa y catalasa positivo. Las bacterias del género *N. meningitidis* se clasifican en serotipos en función del reconocimiento del polisacárido capsular mediante sueros hiperinmunes. Se han identificado 13 serotipos, de los cuales A, B, C, W-135 e Y son los principales agentes causantes de enfermedad¹⁵.

N. meningitidis ha causado la enfermedad meningocócica y septicemia desde el siglo IXX. La enfermedad meningocócica se asocia con una tasa de mortalidad del 5-15%, la cual se ha mantenido sin cambios prácticamente

desde 1930¹⁶. La incidencia máxima es en los lactantes de 6 a 12 meses de edad y continúa siendo elevada hasta los 3 años de edad. Un segundo pico de incidencia se encuentra en los adolescentes. A partir de los 20 años, la mayor parte de la población es inmunológicamente “madura” frente a *N. meningitidis* y la incidencia disminuye notablemente, aunque la enfermedad puede ocurrir a cualquier edad¹⁷.

La incidencia de la enfermedad varía según la estación del año y la epidemiología de cada región. Se habla de un brote epidémico cuando existe una incidencia de 10 o más casos por 100.000 habitantes por año¹⁸. La mayor frecuencia de la enfermedad meningocócica se registra en el África subsahariana, en el llamado “cinturón de la meningitis” que va desde el Senegal hasta Etiopía¹⁹.

A nivel mundial, al igual que ocurre en nuestro país, en los últimos años ha ocurrido un cambio en la epidemiología de la enfermedad meningocócica, observándose prácticamente la desaparición de los casos por el serotipo C, lo que puede atribuirse a las campañas de vacunación (entre 1996 y 1999), y han aumentado los casos por el serotipo B²⁰. En América latina, la enfermedad meningocócica se considera endémica, con apariciones periódicas de brotes y epidemias en los últimos decenios. Los principales serotipos encontrados son A, B y C²¹. Actualmente, en Uruguay el único serotipo aislado en Montevideo y Canelones ha sido el serotipo B²².

El hombre es el único reservorio de *N. meningitidis* serotipo B (MenB), y el primer paso para el establecimiento de un portador es la colonización de las superficies mucosas del tracto respiratorio superior²³. La transmisión meningocócica entre los seres humanos se produce principalmente a través de las gotas de Flugge y de secreciones del aparato respiratorio, el tamaño del inoculo necesario para la transmisión es desconocido²⁴. La transmisión se ve beneficiada por factores como el hacinamiento, contactos directos a través de la mucosa oral, lesiones en la mucosa de la nasofaringe, hábito tabáquico, coinfección con especies de la virus *influenzae* y/o *Mycoplasma*²⁵.

Los mecanismos que conducen desde la colonización hasta la enfermedad meningocócica son todavía desconocidos, pero se cree que son el resultado de factores de virulencia de la bacteria, las condiciones ambientales y la susceptibilidad del huésped. La adhesión de *N. meningitidis* a la mucosa nasofaríngea humana es fundamental para su supervivencia, se han identificado múltiples adhesinas (Pili, PilC, PilQ, Opa, Opc, LOS, Por A, HrpA, PorB, NadA) que se unen a receptores presentes en humanos (Factor activador de plaquetas, CD46, CEACAM1, las integrinas vitronectina y α -actinina, receptor 3 del complemento, laminina). El contacto inicial de la bacteria con células epiteliales de la nasofaringe está mediado por el pili tipo IV que se une a receptores de integrinas o a CD46. Los meningococos proceden a proliferar en la superficie de las células epiteliales no ciliadas humanas formando micro colonias en el sitio de fijación inicial. La íntima asociación es mediada por complejos de proteínas de la opacidad bacterianas (*bacterial opacity proteins*), Opa y Opc con CD66/CEACAMs e integrinas respectivamente, sobre la superficie de la célula epitelial y lo cual dispara la internalización del meningococo²⁶). El meningococo puede atravesar superficies mucosas, entrar al torrente sanguíneo y producir una infección sistémica. Una vez que se obtiene acceso a la corriente sanguínea, estos pueden multiplicarse rápidamente a niveles altos. Los meningococos también pueden traspasar a través de la barrera hematoencefálica, proliferar en el sistema nervioso central y causar meningitis. La capacidad de causar enfermedad invasiva depende de factores ambientales, factores de virulencia de meningococo y la falta de una "respuesta inmune protectora". El meningococo puede penetrar entre las células epiteliales o endoteliales, transportándose a través de transcitosis a través de ellas o se transportan a través del epitelio y las barreras dentro de las células endoteliales (teoría del caballo de Troya). Los eventos moleculares observadas in vitro para la invasión de células epiteliales son similares a las células endoteliales. El papel de los "factores de permeabilidad" no se entiende bien. Los principales contribuyentes del meningococo a la enfermedad meningocócica invasiva incluyen: polisacárido capsular, otras estructuras de la superficie [pili, OMP (proteínas

externas de membrana, por ejemplo PorA, PorB, Opa, OPC), lipooligosacárido (LOS)] y el genotipo. La resistencia del complemento mediada por lisis y fagocitosis se determina por la expresión de la cápsula y el lipooligosacárido. La endotoxina meningocócica lanzada en vesículas también juega un importante papel en los eventos inflamatorios de la meningococemia y la meningitis meningocócica. LOS juega un papel en la adherencia del meningococo y la activación del sistema inmune innato. La gravedad de la sepsis meningocócica se ha correlacionado con niveles circulantes de LOS meningocócicos. Los pili y otros OMPs facilitan la adherencia de los meningococos a las superficies endoteliales. Aunque múltiples factores de virulencia, influyen en la enfermedad invasiva y algunos son el foco de nuevas vacunas, dos estructuras, LOS y cápsula, juegan un papel crítico en la virulencia meningocócica²⁷. La alteración del endotelio capilar activa los sistemas intrínsecos y extrínsecos de la coagulación, y se incrementa la actividad pro coagulante²⁸. Se ha demostrado que hay una mayor tasa de mortalidad y complicaciones en los casos de enfermedad meningocócica en los cuales está presente la fase septicémica²⁹.

OBJETIVO GENERAL

El objetivo de esta monografía ha sido revisar los datos bibliográficos publicados sobre la aplicación de vacunas tradicionales y la aplicación de nuevas tecnologías para el desarrollo de racional de una nueva vacuna. En particular el estudio se centra en la nueva vacuna contra *Neisseria meningitidis* serotipo B creada mediante vacunología reversa.

METODOLOGÍA

El trabajo se desarrolló mediante la búsqueda bibliográfica de artículos científicos que fueran completos y gratuitos (*free full text*) en las base de datos vinculados al tema a estudiar (Pubmed, Timbó, Ebsco) y en libros de texto relacionados. Para la búsqueda se utilizaron palabras claves como: vacunas humanas, *Neisseria meningitidis* subtipo B, vacunología reversa, vacuna

4CMenB, Bexsero®. El desarrollo de la monografía incluyó la lectura, análisis y síntesis de artículos de seleccionados. El proceso de desarrollo y seguimiento de la monografía se realizó manteniendo instancias semanales de discusión intragrupal e instancias quincenales de discusión con el orientador (un total de 8 instancias).

RESULTADOS

1. Vacunas meningocócicas

Las cepas del serotipo B de *N. meningitidis* son la principal causa de enfermedad invasiva y las que presentan una mayor diversidad genética, por lo cual ha sido complejo crear vacunas efectivas y, por tanto, difícil reducir la morbimortalidad de la enfermedad. La estrategia de prevención más efectiva para el control de la enfermedad meningocócica es la vacunación. Para un mejor impacto en la prevención se requiere incorporar vacunas en forma temprana a los calendarios de vacunación infantil. El desarrollo de vacunas eficientes contra *N. meningitidis* fue en los años sesenta³⁰, lo cual hace que la historia en el desarrollo de las mismas sea relativamente reciente.

Las primeras vacunas meningocócicas efectivas basadas en el polisacárido capsular purificado de la bacteria se desarrollaron frente a los serotipos A y C³¹, demostrando que el polisacárido resultante era seguro y no reactogénico³². Veinte años después se desarrollaron vacunas similares contra los serotipos W135 e Y. Estas vacunas han desempeñado un papel fundamental en la prevención de la enfermedad durante décadas, pero tienen limitaciones importantes: no son inmunógenicas en lactantes, no inducen una buena memoria inmunológica y no generan protección de mucosas. Más allá de los diversos intentos, no fue posible desarrollar una vacuna polisacárida contra el MenB debido a que su polisacárido capsular tiene una elevada similitud antigénica con polisacáridos del tejido neuronal humano y razón por la cual es poco inmunógeno en el hombre³³.

En los años noventa se desarrolló la segunda generación de vacunas antimeningocócicas, las vacunas glicoconjugadas en particular contra el

serotipo C y a partir de 1999 se introdujeron en muchos países europeos, Australia, y Canadá. En el año 2005 se aprobó en EE.UU. la primera vacuna glicoconjugada contra los serotipos A, C, W135 e Y. El uso de vacunas antimeningocócicas conjugadas ha significado un paso decisivo para la prevención de la enfermedad, dado que la conjugación permitió superar las limitaciones de las vacunas polisacáridas, sin embargo tampoco fue posible desarrollar una vacuna contra el serotipo MenB³⁴.

Las vacunas de tercera generación fueron desarrolladas contra el serotipo MenB, la estrategia para desarrollar estas vacunas se han centrado en antígenos no capsulares. Los primeros intentos de preparar una vacuna contra el serotipo B se realizaron con vesículas de membrana externa (*Outer Membrane Vehicle*, OMV) de *N. meningitidis*, que contienen varios antígenos inmunogénicos, incluido un LOS y la porina A (PorA). Sin embargo, el LOS es una endotoxina para el huésped y, aunque se realizaron intentos por eliminarlos con detergentes, genera mayor reactogenicidad, desechando la posibilidad de una vacuna con este compuesto. Por tanto, se desarrollaron vacunas conteniendo la PorA purificada como principal antígeno. Las vacunas basadas en OMV inducen una respuesta inmunológica robusta, y las vacunas basadas en PorA producen una respuesta inmunológica específica de la cepa y en el lactante no es suficientemente inmunógena debido a que la PorA es altamente variable en las cepas del serotipo MenB. Las vacunas tipo OMV son las únicas vacunas actualmente disponibles para controlar las epidemias causadas por una cepa hipervirulenta concreta de MenB y solo proporcionan una protección a corto plazo. Estas vacunas solo son efectivas en epidemias debidas a una cepa que exprese específicamente la PorA³⁵.

2. Diseño racional de una vacuna contra el serotipo MenB

La considerable diversidad de las proteínas externas de la membrana que causan la enfermedad del serotipo MenB y la escasa inmunogenicidad del polisacárido capsular, así como también las variaciones geográficas y las posibles variaciones temporales, limitan la utilidad de las vacunas desarrolladas

contra este serotipo. La innovación de nuevas tecnologías aplicadas al desarrollo racional de vacunas contra patógenos para los cuales las vacunas actuales no eran satisfactorias, ha permitido identificar genes de proteínas capaces de realizar una fuerte respuesta de inmunidad contra el serotipo B. Para ello se ha utilizado principalmente la técnica de la vacunología reversa³⁶.

En los últimos años, el campo de la vacunología reversa produjo un impacto significativo en salud pública y los pioneros desarrollarla han sido el italiano Rino Rappuoli y sus colegas³⁷. La vacunología reversa comienza con la secuenciación del genoma del patógeno en estudio, esta secuencia permite una aproximación al repertorio de proteínas que podría expresar el agente a lo largo de su ciclo vital³⁸. Luego de la secuenciación se realiza un análisis bioinformático del genoma, que permite diferenciar si una proteína es de membrana o secretada, y en algunos casos permite pronosticar propiedades antigénicas al identificar regiones de unión al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). En función de ello, se seleccionan los candidatos vacunales, se amplifican del genoma mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Luego las secuencias amplificadas se clonan en vectores de expresión para expresar y purificar las proteínas recombinantes, las que serán utilizadas en la inmunización de animales de experimentación para finalmente ser evaluados en cuanto a la capacidad de lograr una respuesta inmune protectora³⁹. La vacunología reversa tiene limitaciones, dado que no es capaz de reconocer antígenos de conformación polisacárida, y tampoco es capaz de predecir una eficaz respuesta patógeno-huésped partiendo sólo del análisis informático de los posibles candidatos vacunales⁴⁰.

El desarrollo de la vacunología reversa ha generado la posibilidad de encontrar vacunas contra patógenos como *N. meningitidis* serotipo B, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pyogenes* (GAS), *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*. Hoy en día existen más de 11500 proyectos de secuencias de genoma para una posible utilización en el desarrollo de vacunas⁴¹. El avance en el desarrollo de nuevas vacunas utilizando la plataforma de la vacunología reversa para *N. meningitidis* serotipo B, GBS, GAS, *S. pneumoniae* y *E. coli* desde 1995 hasta 2003 puede verse en la Figura 2.

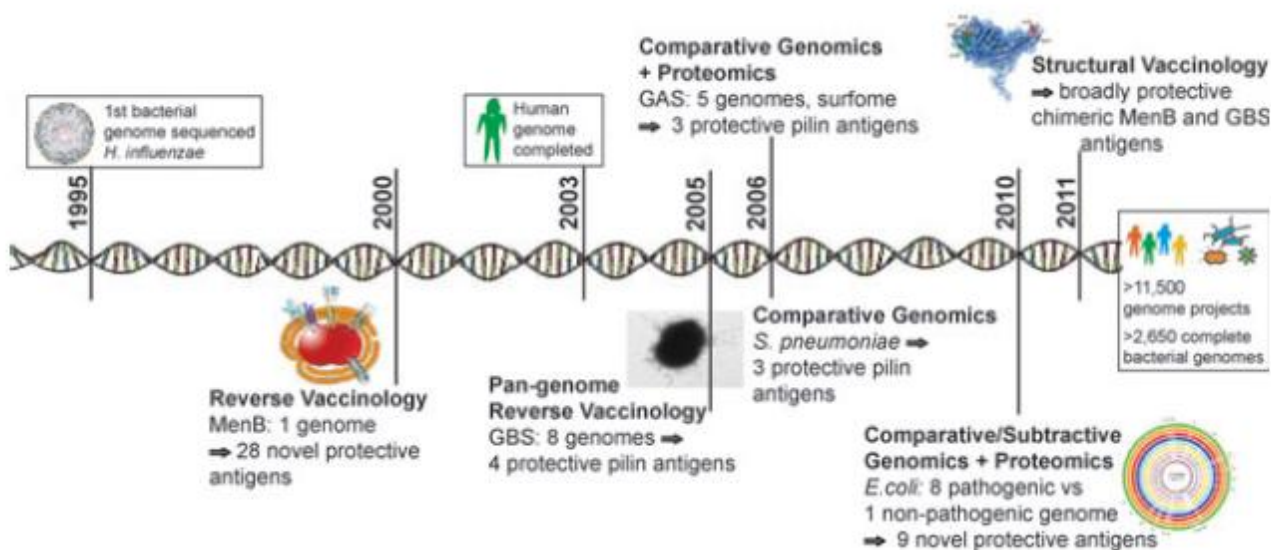


Figura 2: Línea de tiempo de la vacunología reversa (Tomado de Seib et al., 2012⁴²)

En particular, el primer ejemplo de un desarrollo de vacunas exitoso mediante la vacunología reversa lo representa la nueva vacuna contra *N. meningitidis* serotipo B denominada 4CMenB (*Bexsero*®). Dicha vacuna fue desarrollada por el grupo de investigación del Dr. Rino Rappuoli dentro del departamento de Investigación y desarrollo (R&D) de Vacunas de la compañía Novartis Vaccines and Diagnostics y aprobada por la Agencia Europea del Medicamento.

El desarrollo de esta vacuna comenzó con la secuenciación genómica del microorganismo. Esta secuencia fue analizada mediante software bioinformáticos específicos que definen ORF (marcos abiertos de lectura), es decir fragmentos de ADN que potencialmente pueden codificar proteínas, además establecen si son proteínas de secreción o no y las posibles funciones de aquellos genes. Se analizaron todos los ORF encontrados para MenB de manera de predecir las secuencias de péptidos e identificar regiones de membranas hidrófilas y lipoproteínas. Este análisis identificó 600 ORF que se clasificaron en base a sus características distintivas: 13% correspondían a proteínas de membrana o sus productos, 20 % eran lipoproteínas, 27 % eran

proteínas periplasmáticas, 34% eran proteínas de membrana interna y el 6% eran proteínas homólogas. Todos estos ORF fueron amplificados mediante PCR y clonados en vectores de expresión en *E. coli*. Se expresaron 350 proteínas recombinantes las cuales se purificaron y se utilizaron para inmunizar animales de experimentación (ratones), en particular los investigadores estaban interesados en seleccionar proteínas que se expresaran en la superficie de la bacteria. De dichos ensayos se obtuvieron muestras de suero con las cuales se confirmó la expresión de las proteínas *in vivo* y su localización en la membrana externa. Para ello, se utilizaron las técnicas de *Western blot*, ELISA y *fluorescence-activated cell sorter* utilizando extractos de la superficie de *N. meningitidis*. Además, se evaluó la actividad bactericida del suero, para conocer la correlación con la protección en humanos. Como resultado del análisis de inmunogenicidad, los investigadores lograron identificar 28 proteínas potencialmente antigénicas que producían anticuerpos bactericidas en suero⁴³.

Posteriormente, se realizó una evaluación para confirmar que estas 28 proteínas eran antigénicas en pacientes con la enfermedad meningocócica. Debido a que los 28 potenciales antígenos estaban conservados se realizó una selección en base a la capacidad de inducir una amplia protección a través del ensayo SBA (ensayo de la actividad bactericida del suero o "*serum bactericidal activity*"), y la capacidad de inducir protección pasiva en los ensayos realizados con crías de ratas y ratones. A partir de estos ensayos, fueron seleccionados 3 antígenos: antígeno de Neisseria de unión a heparina (NHBA o GNA2132), proteína de unión al factor H (GNA1870 o fHbp), y adhesina A de Neisseria (NadA o GNA1994). Debido a que los antígenos GNA1030 y GNA2091 también indujeron inmunidad protectora fueron fusionados con los antígenos NHBA y fHbp, respectivamente, y se les evaluó la inmunogenicidad. Sin embargo, ninguna de las fusiones produjo una respuesta inmune adecuada para cubrir todas las cepas probadas⁴⁴.

Para el desarrollo de la vacuna, los investigadores utilizaron como estrategia combinar los tres antígenos recombinantes en una vacuna, dado que esto confiere mejor protección, generando una vacuna multicomponente (rMenB).

Posteriormente, se añadieron las OMV de una cepa epidémica de Noruega (OMVnw) y se realizaron algunos ensayos con esta combinación (rMenB + OMVnw). Los ensayos de inmunogenicidad mostraron utilizando la OMVnw no se consigue una cobertura total contra todas las cepas evaluadas. Por ello, se sustituyeron las OMVnw por las OMV de una cepa epidémica purificada en Nueva Zelanda (OMVnz) que proporciona más cobertura, dando lugar a la vacuna con sus cuatro componentes: rMenB + OMVnz o también 4 CMenB. La composición final de la vacuna 4CMenB contiene 50 g de neisseria adhesina (NadA), unión al factor proteína H (fHbp)-GNA2091, y unión al antígeno de heparina de neisseria (NHBA)-GNA1030, y 25 g de vesículas de membrana externa (OMV) no tóxico de la cepa Nueva Zelanda 98/254. También contiene 1.5 mg del adyuvante hidróxido de aluminio, 3.25 mg NaCl, y 10 mM de histidina. Se administra por vía intramuscular⁴⁵. En la Figura 3 se muestra el proceso de obtención de la vacuna.

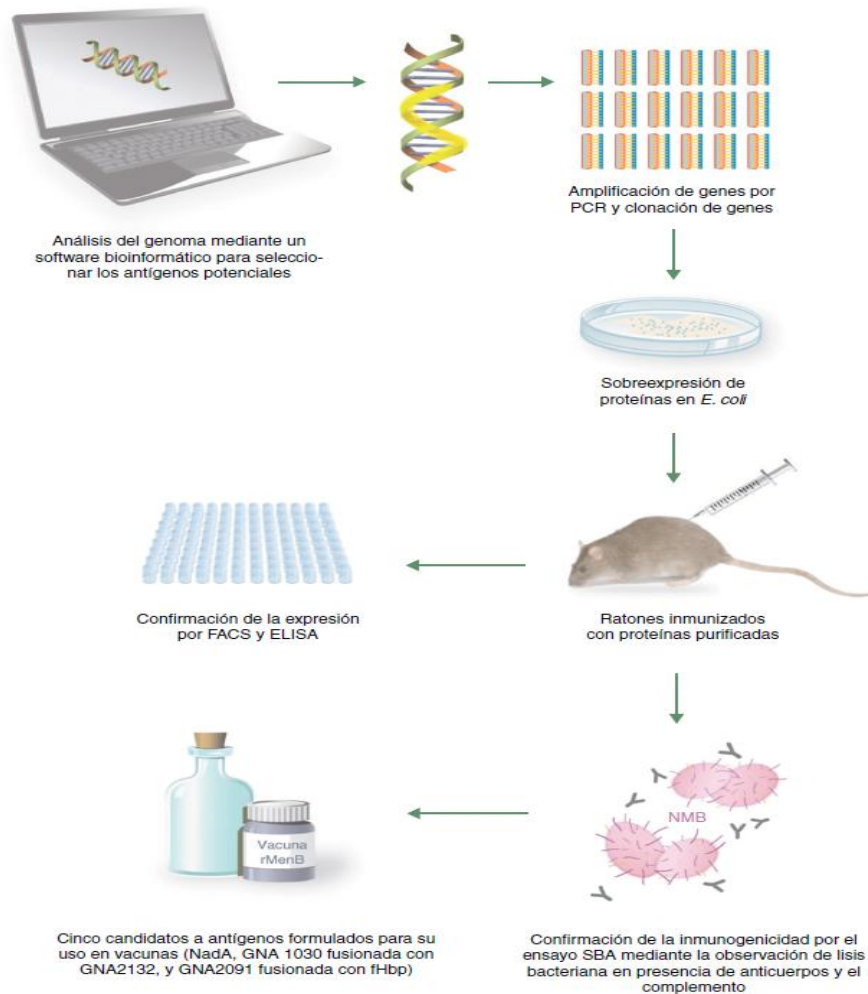


Figura 3: Proceso de obtención de la vacuna 4CMenB mediante vacunología inversa (Tomada de Gil et al., 2014⁴⁶).

Los antígenos incluidos en la vacuna tienen las siguientes funciones en la bacteria:

- *NadA*: existen 5 variantes conocidas (Nad1-Nad5). Promueve la adhesión e invasión de las células epiteliales del huésped, cumpliendo un papel importante en los portadores de la enfermedad. Tiene capacidad de unión a células dendríticas y macrófagos, mejorando respuesta inmunológica del NadA y presentación a los linfocitos. La creación de anticuerpos específicos contra esta proteína podría interferir en la colonización y, por tanto, prevenir el estado de portador⁴⁷.

- *fHbp*: lipoproteína de superficie de *N. meningitidis* y se puede clasificar 3 variantes (1-3) o en 2 subfamilias (A para las variantes 2 y 3, y B para la variante 1) según el autor. La lipoproteína se une al inhibidor de la vía alternativa al complemento del huésped (Factor H), evadiendo la acción del complemento y aumentando la supervivencia de la bacteria. *In vitro* se une también a la enterobactina siderófora de la bacteria. Al bloquear esta lipoproteína mejoraría la capacidad de nuestro sistema inmunológico para eliminar el microorganismo⁴⁸.

- *NHBA*: lipoproteína de superficie de *N. meningitidis*, objetivo de proteasas humanas y meningocócicas que, *in vitro*, se une a la heparina. En ausencia de la cápsula bacteriana, su unión a la heparina mejora la supervivencia de la bacteria en el suero humano y podría facilitar su unión a tejidos del huésped. No obstante, este antígeno es aún poco conocido⁴⁹.

- *OMVnz*: las vesículas OMV proceden de una cepa epidémica de Nueva Zelanda, NZ 98/254 (B:4:P1.7-2,4) y fueron utilizadas para la creación de vacunas para hacer frente a una epidemia en ese país. Sin embargo, su protección es muy específica, ya que se debe principalmente a su antígeno inmunodominante PorA, el cual es muy variable. Su inclusión en la vacuna 4CMenB incrementa su inmunogenicidad, además de ofrecer protección para las cepas que expresan el serosubtipo de PorA P1.4.

Para evaluar la inmunogenicidad de cada uno de los componentes de la vacuna 4CMenB en los estudios clínicos, se utilizan cepas específicas que expresan exclusivamente uno de los antígenos y no los demás contenidos en la vacuna, con el objetivo de analizar de forma independiente la respuesta a cada uno de los 4 componentes. En los ensayos clínicos, las cepas utilizadas son 44/76-SL (respuesta *fHbp*), NZ98/254 (respuesta PorA), 5/99 (respuesta NadA) y M10713 (respuesta NHBA), aunque esta cepa se identificó más tarde y se analizó solo en los estudios más recientes⁵⁰.

Cobertura Vacunal

The Meningococcal Antigen Typing System (MATS) fue diseñado para predecir la cobertura de vacunas categorizando el nivel de expresión de antígenos y variabilidad de secuencias a través de un grupo de enfermedades asociadas a MenB. La comparación se realiza a través de estudios ELISA. Para esta vacuna, MATS muestra un potencial de cobertura del 70-80% de las cepas circulantes en Europa. Los ensayos clínicos demuestran que la vacuna es inmunógena y segura en lactantes, niños, adolescentes y adultos, e induce memoria inmunológica. La incidencia de fiebre es similar a la de vacunas incluidas en el esquema de vacunación español, pero mayor cuando se coadministra con ellas, aunque el patrón de fiebre es predecible y autolimitado⁵¹. Estudios realizados en España demuestran que la misma es compatible con las demás vacunas incluidas en el esquema de vacunación de dicho país pudiendo administrarse simultáneamente con las vacunas hexavalentes y pentavalentes actualmente disponibles, así como con la vacuna antineumocócica conjugada⁵².

Con respecto a la bioseguridad de la vacuna 4CMenB, los laboratorios NOVARTIS® tienen la patente de la vacuna y ellos se han encargado del primer ensayo de bioseguridad en humanos. En esta primera instancia hubo un total de participantes de 70 personas elegidas al azar, a las cuales se les administro 3 dosis de 4CMenB (n = 28), rMenB + OMVnz (n = 28) o rMenB (n = 14). Todos los participantes fueron incluidos en el análisis de bioseguridad. De todos los participantes, dos de ellos no completaron el ensayo, uno por una linfadenopatía sin relación con la vacuna y el segundo abandonó el ensayo. Durante las visitas clínicas, el dolor del sitio de inyección fue reportado una hora después de una o más vacunas. Dentro del grupo que recibió la 4CMenB, se reportó que un individuo sufrió de eritema en el sitio de la inyección e induración dentro una hora después de la vacunación, y otro sufrió de reacciones sistémicas de mialgia y dolor de cabeza. Las reacciones de náuseas, malestar general, fatiga, mialgia, artralgia y dolor de cabeza dentro de

una hora de la vacunación fueron reportadas por un 1 participante en el grupo rMenB + OMVnw, y fue reportada una reacción de mialgia en un destinatario rMenB.

Dentro de los 7 días de la vacunación, 69 de 70 participantes informaron una o más reacciones adversas, la de mayor frecuencia fue la de dolor en el sitio de inyección (figura 4). Estos eventos fueron auto limitados, y hubo evidencia de un aumento de la reactividad al repetir la vacunación⁵³.

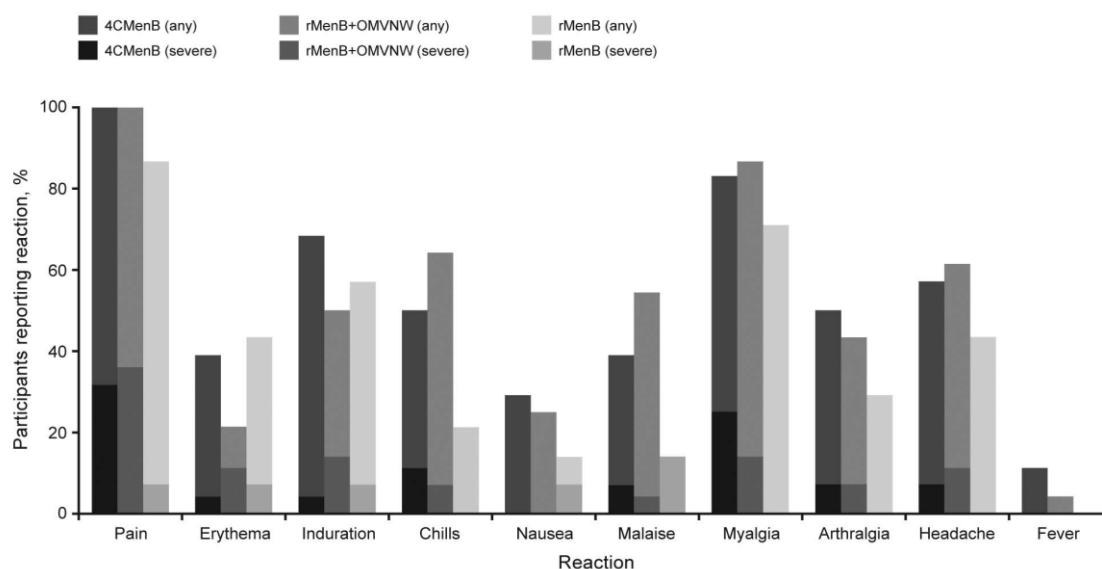


Figura 4: Reacciones locales y sistémicas dentro de los 7 días posteriores a cualquier vacunación para las 3 variaciones de vacunas utilizadas en dicho estudio: 4CMenB; rMenb + OMVnz; rMenB. (Tomado de Toneatto et al., 2011⁵⁴)

Con respecto a la bioseguridad, en lactantes y niños menores de 2 años, las reacciones adversas locales y sistémicas más comúnmente observadas fueron el dolor agudo y eritema en el lugar de inyección, fiebre e irritabilidad. En los estudios clínicos en lactantes, la fiebre aparecía más frecuentemente cuando 4CMenB se coadministraba con las vacunas sistemáticas que cuando se administraba sola. Cuando apareció la fiebre, normalmente siguió un patrón predecible y auto limitado (inicio a las 6 horas de la inyección, pico al segundo día, cese al tercer día), clínicamente poco significativo, y se puede prevenir con la administración profiláctica de paracetamol⁵⁵.

A la fecha más de 6400 personas en estudios clínicos recibieron la vacuna 4CMenB. Más de 4800 eran niños y 1600 adolescentes y adultos. Los estudios se introdujeron en varias áreas geográficas incluyendo Europa, Sudamérica y Norteamérica. En un primer estudio se vacuna se administró a los 2, 4, 6 y 12 meses de edad como única dosis a los 12 meses mientras que en el segundo estudio 60 niños fueron inmunizados a los 6, 8 y 12 meses. En primera instancia ambos estudios resultaron favorables a nivel inmunogénico (se obtuvo la medición de la inmunogenicidad a través del ensayo SBA), luego de la segunda dosis y la inmunogenicidad aumento aún más en la tercera dosis y con el refuerzo a los 12 meses (figura 5). También se identificó mayor respuesta en la administración de varias dosis que en aquellos que recibieron solamente una dosis inicial a los 12 meses⁵⁶.

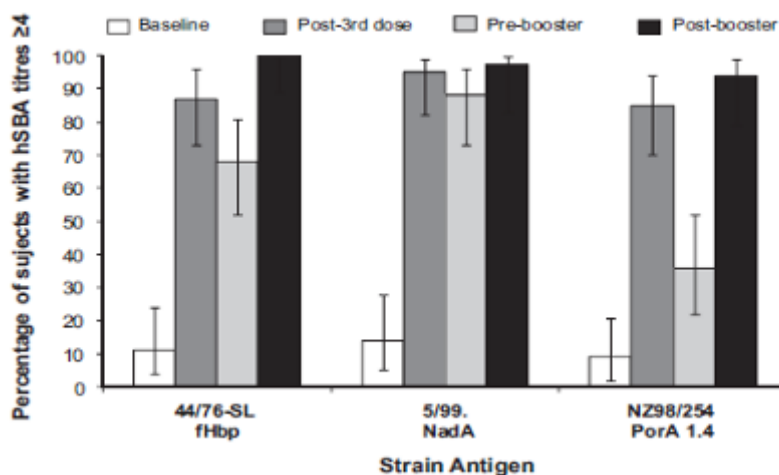


Figura 5: Inmunogenicidad de 4CMenB administrada en series de 3 dosis a los 2, 4 y 6 meses más refuerzo de dosis a los 12 meses. Los distintos grupos difieren en los antígenos Fhbp, NadA, PorA. (Tomado de Toneatto et al., 2011⁵⁷)

Por tanto se demuestra que 4CMenB es bien tolerada e inmunogénica en infantes con evidencia de inducción de inmunidad memoria⁵⁸.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

La vacuna contra el *N. meningitidis* serotipo B, 4CMenB, recientemente incluida en varios calendarios de vacunación de distintos países, dado por su aprobación por la Agencia Europea del Medicamento, abre un capítulo de esperanza en la prevención de esta enfermedad. La vacuna 4CMenB tiene una buena cobertura potencial, debido a que, tras su desarrollo a través de la vacunología reversa, está compuesta por 3 proteínas (fHbp, NHBA, NadA) las cuales cumplen con los requisitos fundamentales: expresión en la superficie bacteriana, secuencia nucleótida del gen conservada entre distintas cepas del meningococo e inducción de anticuerpos bactericidas en presencia de complemento humano. Todo esto nos permite una amplia cobertura en un cierto número de cepas, a diferencia de las vacunas anteriores en las cuales a diversidad genómica de los patógenos era un gran problema. Por lo que se ha dado un gran paso a futuro para la erradicación de dicha enfermedad.

Esta vacuna se empieza a dar a lactantes a partir de los 2 meses de edad, a través de diversos estudios ha quedado demostrado que tras la primovacuna así como también de las próximas dosis, se vio un aumento en la protección inmunológica contra los distintos antígenos que componen la vacuna. Por lo cual podemos centrar nuestras expectativas de que a través de un buen plan de vacunas, podremos proteger a la población más indefensa y afectada por la enfermedad causada por la *N. meningitidis* serotipo B, evitando de buena manera la aparición de nuevos brotes epidemiológicos de las cepas del serogrupo MenB.

Otro factor positivo a destacar de la capacidad de abarcar varias cepas del serotipo MenB, es que esta vacuna será de gran utilidad a nivel mundial ya que no está restringida a su uso en una sola región.

En cuanto a la tolerancia de la vacuna, los ensayos de bioseguridad han demostrado que no se generan un aumento en la incidencia o gravedad de las reacciones adversas con las dosis de la pauta de vacunación. Siendo los principales efectos adversos dolor en el sitio de inoculación y fiebre en algunos

casos, lo cual no contrarresta los beneficios de dicha vacuna. Por lo que podemos decir que en este sentido dicha vacuna es segura.

Gracias al desarrollo de la 4CMenB ahora frente a un nuevo brote epidémico tendremos esta nueva herramienta para poder contrarrestarlo en las regiones que dicha vacuna aún no esté incluida en un plan de vacunación.

Los avances biotecnológicos han permitido la secuenciación del genoma de numerosos microorganismos revolucionando de esta manera el desarrollo de las vacunas. Este nuevo enfoque ha sido denominado Vacunología Inversa y comienza por el análisis de las secuencias del genoma, mediante el uso de herramientas de bioinformática que permiten identificar los antígenos más probables a ser candidatos vacunales. De esta forma se ha conseguido generar vacunas contra distintos patógenos como lo son el *N. meningitidis* serotipo B, *Streptococcus agalactiae* (GBS), *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

^{1, 2} Berdasquera CD, Cruz G, Suárez C. La vacunación. Antecedentes históricos en el mundo. Revista Cubana Medicina General Integral. 2010; 16(4):375-8.

³ Nossal GJV. Vaccination. John Wiley & Sons Ltd, Chichester [internet]. 2005. Disponible en: <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0003971]

^{4, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14, 37} Schussek S, Trieu A, Doolan D. Genome- and proteome-wide screening strategies for antigen discovery and immunogen design. Biotechnology Advances. 2014; (32): 403–414

^{5, 7} Finco O, Rappuoli R. Designing vaccines for the twenty-first century society. Front Immunol. 2014;5-12

^{11, 30, 31, 33, 34, 35, 44, 46, 48, 49, 52, 55} Gil A, Barranco D, Batalla J, Bayas J.M, Campins M, Gorrotxategi P, Melladoi M.J, Moreno-Pérez D, Lluchg J, Martín-Torres T, Uriel B, Vázquez J.A. Prevención de la enfermedad meningocócica por el serogrupo B mediante una vacuna de 4 componentes. *Anales de Pediatría*. 2014; 80(4):259.e1---259.e23.

^{15, 17, 18, 28} C. Cabellos. Capítulo 245 Infecciones Meningococcicas. En: C. Rozman, F. Cardellach. *Farreras - Rozman Medicina Interna Vol. 2*. 17ª edición. España: ELSEVIER; 2012. p. 2016-2019.

^{16, 25} Pace D, Pollard A. Meningococcal disease: Clinical presentation and sequelae; Vaccine [Internet]. 2012. Disponible en www.elsevier.com/locate/vaccine

¹⁹ WHO/OMS [Internet] <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs141/es/>

²⁰ Halperin A, Bettinger J, Greenwood B, Harrison L, Jelfs J, Ladhani S, McIntyre P, Ramsay M, Sáfadi M. The changing and dynamic epidemiology of meningococcal disease. Vaccine [Internet]. 2012. Disponible en www.elsevier.com/locate/vaccine

²¹ Sáfadi M, González-Ayala S, Jäkel A, Wieffer H, Moreno C, Vyse A. *The epidemiology of meningococcal disease in Latin America 1945–2010: an unpredictable and changing landscape*. Cambridge University Press. 2012.

²² Pérez M.C, Picón T, Galazka J, Rubio I, Montano A, Ferrari A. Control de un brote epidémico de enfermedad meningocócica por *N. meningitidis* serogrupo B. *Revista Médica del Uruguay*. 2004; (20): 92-101.

^{23, 29} Hill D, Griffiths N, Borodina E, y Virji M. Cellular and molecular biology of *Neisseria meningitidis* colonization and invasive disease. *Clinical Science*. 2010; (118): 547–564.

^{24, 26, 27} Stephens D. Biology and pathogenesis of the evolutionarily successful, obligate human bacterium *Neisseria meningitidis*. *Vaccine* 2009; (27S): B71–B77

³² Vipond C, Care R, Feavers IM. History of meningococcal vaccines and their serological correlates of protection. *Vaccine*. 2011; (30S): B10–B17.

³⁶ Panatto D, Amicizia D, Lai PL, Cristina ML, Domnich A, Gasparini R. New versus old meningococcal Group B vaccines: How the new ones may benefit infants & toddler. *Indian Journal of Medical Resech*. 2013; 138(6): 835–846.

^{38, 40} Rappuoli R. Reverse Vaccinology, *Microbiology*, 2000; **3**:445–450

³⁹ Ferreira J, Porco A, Vacunas derivadas del análisis de los genomas: vacunología reversa, *Interciencia* 2008; 33; p 353-358

^{41, 42} Seib KL, Zhao X, Rappuoli R. Developing vaccines in the era of genomics: a decade of reverse vaccinology. *Novartis Vaccines and Diagnostics*. 2012; (10.1111): 1469-0691.

⁴³ Serruto D, Adu-Bobie J, Capecchi B, Rappuoli R, Pizza M, Masignani V. Biotechnology and vaccines: application of functional genomics to *Neisseria meningitidis* and other bacterial pathogens. *Journal of Biotechnology*. 2004:15–32.

^{45, 47, 50, 51, 56, 58} Dull PM. & McIntosh ED. Meningococcal vaccine development – from glycoconjugates against MenACWY to proteins against MenB – potential

for broad protection against meningococcal disease. *Vaccine*. 2012; (30S):B18–B25.

^{53, 54, 57} Toneatto D, Ismaili S, Ypma E, Vienken K, Oster P, Dull P. The first use of an investigational multicomponent meningococcal serogroup B vaccine (4CMenB) in humans. *Human Vaccines*, 2011, 7:6, 646-653.