

Bases inmunológicas para el desarrollo de una vacuna para coronavirus

L. Enjuanes, M.J. Bullido, I. Correa, C. Suñé, F. Gebauer, C. Smerdou, S. González, I.M. Antón y C.M. Sánchez

Centro de Biología Molecular.
CSIC-Universidad Autónoma. Madrid.

Epidemiología del virus de la gastroenteritis porcina transmisible (VGPT) y coronavirus relacionados

Se han descrito coronavirus que infectan al hombre y a animales domésticos. Estos virus se clasifican en 4 grupos serológicos¹, dos de los cuales incluyen virus de mamíferos y dos, virus de las aves. Uno de los grupos de virus de mamíferos tiene como prototipo el VGPT, que produce una mortalidad alta en lechones recién nacidos, por lo que es importante desde un punto de vista económico. Este virus se utiliza como un modelo para el desarrollo de vacunas que protejan frente a infecciones en mucosas y para estudiar las bases moleculares de la virulencia y del tropismo de los coronavirus.

La demostración de la etiología vírica de esta enfermedad fue realizada por Doyle y Hutchings en 1946. Hasta hace dos décadas, las epidemias de GPT en los EE.UU. y en Europa fueron principalmente reconocidas como epizootias agudas que tenían lugar en los meses de invierno. La incidencia de la enfermedad parecía tener un curso cíclico. Actualmente, el VGPT es enzoótico, particularmente en las granjas grandes. En Europa, la prevalencia de la GPT está disminuyendo, mientras que en los EE.UU., en 1987, el VGPT se encontró en casi la mitad de las granjas y es la primera causa de enteritis vírica, ya que el 26 % de los casos con enteritis neonatal sometidos a diagnóstico de laboratorio fueron producidos por el VGPT.

Un segundo coronavirus entérico, el virus de la diarrea epidérmica porcina (VPED), no relacionado seriológicamente con el VGPT, fue aislado por primera vez en Bélgica en 1977, y se detectó en España en 1986². Recientemente se ha descrito una variante del VGPT, el coronavirus respiratorio porcino (VPRC)³, que se ha extendido rápidamente por Europa.

El VGPT tiene un tropismo preferencialmente entérico, aunque la replicación de aislados naturales del VGPT también tiene lugar en el tracto respiratorio. Los aislados del VGPT que

han sido pasados en cultivos celulares pierden gradualmente su tropismo por el tracto entérico, aumentando el tropismo por los tejidos respiratorios. El VGPT infecta enterocitos, células epiteliales alveolares y bronquiolares, y macrófagos intestinales y alveolares, pero no de sangre periférica.

Se han descrito dos tipos de receptores para los coronavirus. Uno de ellos es una glicoproteína de 110 kD altamente específica para el virus de la hepatitis del ratón (VMH). El segundo tipo muestra una reactividad cruzada al nivel de interacciones virus-receptor. El VGPT, el virus de la peritonitis infecciosa felina (VFIP), el coronavirus canino (VCC) y el coronavirus humano 229 (VHC 229E), tienen el segundo tipo de receptor⁴.

El principal transmisor de los virus relacionados con el VGPT es, probablemente, el cerdo. Los animales adultos y las cerdas lactantes son los responsables de la transmisión del virus a los animales jóvenes, a través de las heces, la leche y de los aerosoles generados en el tracto respiratorio. Además, el VGPT se puede replicar en perros, gatos, zorros, estorninos, y, probablemente, en marsupiales arbóreos y roedores acuáticos. No se han detectado signos de infección en ratones, ratas y cobayos.

Variabilidad antigénica y genética del VGPT

El VGPT tiene un genoma de ARN monocatenario positivo de unas 26 kb, con poli A en su extremo 3', que al replicarse produce 7-8 ARNm con un extremo 3' común. El VGPT y coronavirus relacionados constan de tres familias de proteínas estructurales con pesos moleculares relativos de 160-220 kD (proteína S), 47-56 kD (proteína N) y 22-36 kD (proteína M). Además, el genoma vírico codifica varias polimerasas y 3-4 proteínas no estructurales⁵. El VGPT y coronavirus relacionados pueden clasificarse, además de por la estrategia de su replicación,

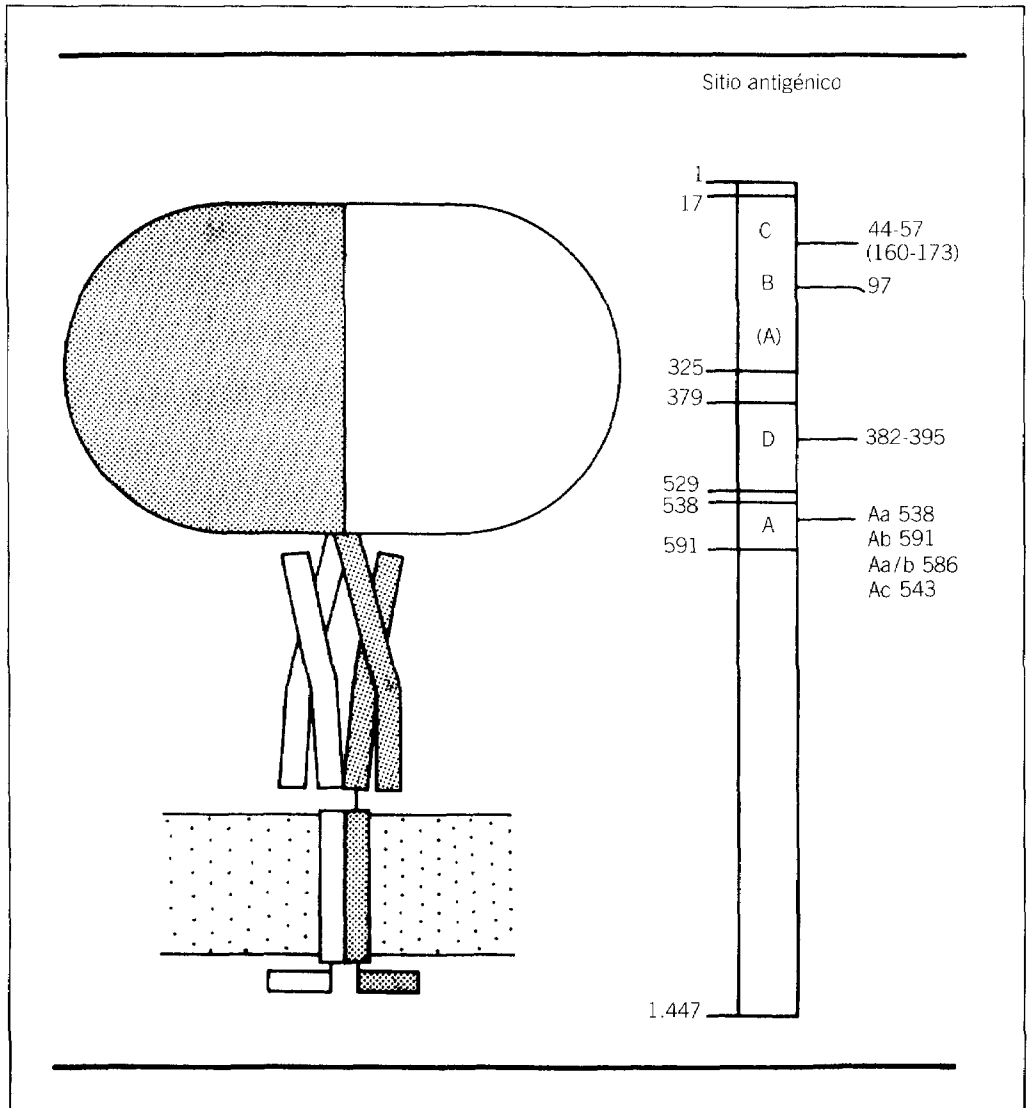


Fig. 1. Correlación entre la estructura física y antigénica de la glicoproteína S del virus VGPT. Los cuatro sitios antigénicos (A, B, C y D) fueron definidos por radioinmunoanálisis competitivo, y los subsitios antigénicos mediante caracterización de mutantes del VGPT resistentes a la neutralización¹⁰. El sitio A estaba formado por aminoácidos situados entre los residuos 538 y 586, y, posiblemente, por aminoácidos localizados entre los 325 residuos aminoterminales. Los números indican los límites de los segmentos de la proteína que forman los sitios antigénicos o las posiciones de residuos implicados en los mismos¹¹.

por su composición en proteínas y propiedades antigénicas. Los coronavirus del grupo del VGPT no tienen una cuarta proteína estructural (la glicoproteína HE), ni su glicoproteína S se corta en dos mitades⁶.

La glicoproteína S forma las espículas (peplómeros) del virus y es el antígeno inductor de anticuerpos neutralizantes⁷⁻⁹. En esta proteína se han diferenciado cuatro sitios antigénicos (A, B, C y D) (fig. 1), estando el sitio A subdividido en

3 subsitios (Aa, Ab y Ac)^{10,11}. Estos sitios se han localizado en la estructura primaria de la proteína S, en el orden C,B,D y A, desde el extremo aminoterminal. El sitio C está localizado entre los residuos 44 a 57 (con la posible contribución de los residuos 160 a 173; el sitio B, alrededor del residuo 97; el sitio D en los residuos 382-389; y el sitio A alrededor de los residuos 538 (Aa), 543 (Ac) y 586-591 (Ab), con la posible contribución de los aminoácidos localizados entre los residuos 1-325^{5,11,12}. Mediante radioinmunoanálisis competitivos, utilizando anticuerpos monoclonales (Acms) obtenidos en diferentes laboratorios hemos diferenciado, al menos, 10 sitios antigénicos, cinco de los cuales están implicados en la neutralización del virus, aunque el sitio A es el mayor inductor de anticuerpos neutralizantes (datos no publicados).

La unión de 42 Acms, que reconocen un mínimo de 25 epítomos a: 1) aislados entéricos del VGPT recogidos en tres áreas geográficas distintas (América, Europa y Asia) durante 41 años; 2) aislados del VPRC, y 3) otros coronavirus, mostró una fuerte homología antigénica entre las proteínas víricas correspondientes (S, M y N) de los virus VGPT, VPRC, VFIP, VFEC y VCC. Por el contrario, no se detectó reactividad cruzada con los virus VPED, VHE 229E, VHC OC43, VHEC, VBC o VMH⁶. Todos los virus VGPT, VPRC, VFIP, VFEC y VCC, contenían el subsitio antigénico Ac, definido por tres Acms que los neutralizaban⁶. Por ello, la presencia del subsitio antigénico Ac en un coronavirus se tomó como base para definir un grupo antigénico, cuyos miembros tienen en común: a) epítomos en las tres proteínas estructurales; b) la falta del procesamiento que corta a la proteína S en dos mitades, y c) la ausencia de la proteína HE.

La unión de Acms a los virus VGPT, VPRC y coronavirus relacionados mostró una variabilidad antigénica significativa en las tres proteínas víricas. Esta diversidad es mayor en la proteína S, que en las proteínas M o N cuando se consideran sólo los virus VGPT. De los cuatro sitios antigénicos (C, B, D y A) definidos previamente^{10,11}, los sitios C y B mostraron poca variabilidad cuando sólo se compararon aislados del VGPT entre sí, aunque mostraron una variabilidad elevada cuando se incluyeron coronavirus relacionados con el VGPT, ya que estos sitios estaban cambiados en aislados de los virus VPRC, VFIP, VFEC, y VCC. El sitio D mostró un nivel intermedio de conservación entre aislados de los virus VGPT y VPRC, mientras que el A

era el más conservado, estando el subsitio Ac presente en coronavirus de, al menos, tres especies (porcina, felina y canina).

La comparación de secuencias entre cuatro genes S, uno de la cepa MIL65 del VGPT y tres de clones de la cepa PUR46⁶, mostró que la proteína S de la cepa MIL65 tenía 1.449 aminoácidos, dos más que los tres clones de la cepa PUR46. Se observó una homología del 97 % entre las proteínas S de las cuatro cepas, tanto a nivel de nucleótidos como a nivel de aminoácidos. El 80 % de los cambios de aminoácidos estaban localizados en la mitad N-terminal de la proteína S, que comprende la porción globular del peplómero, que es la más externa de la partícula vírica. En la mitad C-terminal del peplómero, que forma la parte fibrilar de la espícula vírica que se ancla a la membrana, solamente existen diferencias en ocho residuos. En la proteína S del VGPT no está clara la existencia de dominios altamente variables. En nuestros estudios el porcentaje de residuos cambiados en los sitios A y B fue ligeramente mayor (10 %), que en los sitios C (5 %) y D (1 %) (datos no publicados). Los cambios en aminoácidos en la proteína S de las cepas MIL65 y PUR46 del virus VGPT son, aparentemente, sustituciones que no afectan a los epítomos críticos, ya que los Acms neutralizantes, que se unen a cinco sitios antigénicos diferentes, fueron incapaces de distinguir entre estas cepas¹³. Todas estas observaciones indican que la proteína del peplómero está altamente conservada entre los VGPT.

La homología entre las proteínas M y N de dos cepas del VGPT, la británica (ENG70 (FS772/70)) y la americana PUR46, cuando se compararon tanto a nivel de nucleótidos como de aminoácidos, fue del 98 %, y la mayoría de los cambios fueron conservativos. Los datos sobre las tres proteínas estructurales de los aislados del VGPT indican que existe una conservación elevada entre aislados recogidos en áreas alejadas, y analizados después de un número variable de pases en células en cultivo.

En las proteínas no estructurales (nsp1, nsp2, nsp3 y nsp4) del VGPT hay grandes diferencias entre las zonas intergénicas de dos cepas (MIL65 y PUR46). En cambio, entre las áreas codificantes de las proteínas nsp1, nsp2 y nsp3, sólo se han encontrado sustituciones en 3, 4 y 5 residuos, respectivamente, lo que implica homologías del 95, 98 y 94 %, respectivamente. Se han descrito, por otra parte, resultados análogos para la cuarta proteína no estructural⁹.

La elevada homología antigénica y genética entre los aislados del grupo del VGPT sugiere fuertemente que tienen un origen común. Las diferencias en mapas antigénicos y genéticos de los coronavirus, incluyendo los aislados VGPT y VFIP, indican que en su divergencia se han perdido, ganado o translocado ciertas unidades de transcripción⁶. La importancia de la recombinación del ARN en la evolución de estos virus la sugiere la existencia de recombinación durante la infección por el VMH¹⁴. Los coronavirus porcinos, felinos y caninos pueden infectar el mismo tipo de célula, lo que podría facilitar la recombinación entre ellos. Por el momento, no es posible determinar cuál es el virus más antiguo entre los aislados del grupo del VGPT. El VPRC se detectó 40 años más tarde que el VGPT, se extendió rápidamente, y tiene un genoma más corto que el VGPT, lo que sugiere que este virus pudo derivarse del VGPT. Debido a que el VPRC sensibiliza al sistema inmune contra el VGPT, y a que el VPRC está extendido por toda Europa (y recientemente ha entrado en EE.UU.), podría desaparecer el VGPT.

Protección inmunológica frente a la gastroenteritis porcina transmisible

Las principales pérdidas económicas causadas por el VGPT se deben a su elevada tasa de mortalidad en lechones menores de 10 días, cuyo sistema inmune estaba inmaduro. La muerte de los lechones tiene lugar en 2-3 días, un período de tiempo corto, que no es suficiente para desarrollar una respuesta inmune protectora.

La inmunidad pasiva proporcionada por el calostro y la leche es esencial para transmitir protección contra la infección por el VGPT a los recién nacidos. Las fracciones del calostro y de la leche de cerdos inmunes que contenían las inmunoglobulinas IgG e IgA fueron protectoras cuando se administraron a lechones susceptibles¹⁵. Es decir, los animales recién nacidos pueden ser protegidos por una inmunidad lactogénica natural suministrada por las cerdas o por una inmunidad lactogénica artificial basada en el uso de sueros o Acm protectores. Para inducir anticuerpos en la mamas, las cerdas deben ser inmunizadas, preferentemente en el tracto intestinal, 2 semanas antes del parto. La inmunización en las glándulas mamarias ha dado resultados contradictorios. Algunos autores obtienen protección, mientras que otros no consideran que la ruta intramamaria constituye una alternativa válida a la ruta oral. En contraste, existe un consenso sobre la ineficacia de la ruta intramuscular.

Para obtener inmunidad lactogénica se han utilizado tres tipos de virus: 1) el VGPT virulento; 2) el VGPT atenuado, y 3) coronavirus relacionados con el VGPT (VPRC, VFIP y VCC). La administración del VGPT virulento a las cerdas les induce niveles inmunes protectores para ellas y para proporcionar inmunidad pasiva a lechones lactantes. Dado que la vacunación con el VGPT virulento tiene riesgos obvios, la investigación de vacunas se ha dirigido hacia cepas atenuadas del VGPT, o hacia el uso de coronavirus relacionados. Las vacunas basadas en VGPT atenuado tienen una eficacia limitada debido a la falta de resultados consistentes, a la inducción de epizootias y a la persistencia del VGPT en los animales vacunados. Estudios comparativos de cepas virulentas y atenuadas del VGPT mostraron que las primeras son más estables frente a enzimas pancreáticas, a la acidez y a fluidos intestinales. Esta mayor estabilidad del VGPT virulento le protege de la inactivación durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal y permite su replicación vírica en el intestino delgado, donde estimula la inmunidad secretora. Un clon del VGPT (derivado de la cepa Purdue atenuada), resistente a tripsina y a alfa-quimotripsina, indujo inmunidad lactogénica. Utilizando un proceso de selección por supervivencia en el jugo gástrico, un mutante del VGPT (seleccionado de una variante de bajo peso [D-52]), adquirió, simultáneamente, resistencia a la acidez, a pepsina y a tripsina, e indujo inmunidad protectora cuando se administró oralmente, pero no por ruta intramuscular o intramamaria.

La protección inducida por el coronavirus VPRC, relacionado con el VGPT, ha sido estudiada por varios grupos con una conclusión similar. A pesar de que el VPRC induce anticuerpos neutralizantes para el VGPT, las cerdas inmunes no protegen a sus crías contra la infección intestinal natural con el VGPT. La débil protección puede deberse a la insuficiente estimulación antigénica del tejido linfoide, asociado al intestino, durante la infección por el VPRC, debido a su tropismo respiratorio. Sin embargo, los animales infectados con el VPRC desarrollan una respuesta inmunológica rápida en la infección con VGPT salvaje, la epidemia causada por el VGPT se acorta y la mortalidad de los lechones se reduce. Estos resultados se confirmaron con la asociación entre la diseminación del VPRC y la reducción en la incidencia del VGPT detectada en Francia.

La vacunación contra el VGPT con coronavirus heterólogos como el VFIP y el VCC sólo proporcionó protección parcial. Los experimentos

inversos, es decir, la vacunación para proteger frente al VFIP con vacunas heterólogas de virus vivos (VGPT, VCC y VHC 229E) tampoco proporcionó resultados satisfactorios.

Nuevas tendencias en el desarrollo de vacunas para coronavirus entéricos

El objetivo de una vacuna contra el VGPT es a protección de los lechones recién nacidos a través de la inmunidad lactogénica. Existen al menos dos estrategias para proteger frente a la GPT: 1) la producción de antígenos no infectivos y su inclusión en complejos inmunizantes que se focalicen en el intestino, y 2) el uso de vectores vivos con un tropismo entérico. Ambos procedimientos requieren el estudio de los epítopos reconocidos por los linfocitos B y T implicados en protección, y la búsqueda de moléculas capaces de promover respuestas inmunes que induzcan inmunoglobulinas IgA. Además, la primera estrategia requiere la incorporación a los inmunocomplejos de moléculas con afinidad por las células entéricas del intestino. Los epítopos B que proporcionan protección normalmente inducen anticuerpos neutralizantes, aunque esta propiedad no es una condición necesaria: proteínas que inducen protección contra el virus *Herpes simplex* y citomegalovirus no inducen anticuerpos neutralizantes.

Existen al menos cinco sitios antigénicos implicados en la inducción de anticuerpos neutralizantes para el VGPT: los sitios A, B y D^{10,11,15,17}, y los sitios definidos por los anticuerpos monoclonales 5G1 y 5D5 obtenidos por R.D. Woods y R. Wesley (datos no publicados). De estos cinco sitios antigénicos, el A es el mayor inductor de anticuerpos neutralizantes y está conservado en todos los aislados conocidos del VGPT. El sitio A es complejo, conformacional y dependiente de glicosilación y los sitios B y D son parcial y totalmente, respectivamente, independientes de glicosilación (datos no publicados). El sitio D es reconocido por anticuerpos monoclonales neutralizantes y no neutralizantes¹⁸. Un péptido del sitio D, que incluye los residuos 370-386 (H₂N-SFFSYGEI-COOH) de la proteína S del VGPT, indujo anticuerpos neutralizantes, que tuvieron un título más alto, cuando el péptido se conjugó con un segundo péptido derivado de la proteína S, que incluye los residuos 1160-1180¹⁸. La combinación de estos péptidos podría ser el primer candidato para una vacuna subunidad contra la GPT. Los epítopos neutralizantes seleccionados en estos estudios se definieron usando cultivos celulares de

testículo de cerdo y pueden diferir de los epítopos que inducen anticuerpos neutralizantes cuando se ensaya la infectividad vírica en células epiteliales del intestino, que son las células infectadas *in vivo*.

Los epítopos T potencialmente implicados en protección contra el VGPT se están definiendo mediante el uso de hibridomas T específicos para el virus¹⁹ y líneas celulares T. Utilizando programas se han localizado en los residuos 1060-1087 y 1090-1110 zonas con alta probabilidad de ser sitios T en la proteína S¹¹.

Las inmunoglobulinas con isotipo IgA son más estables que las que tienen isotipo IgG, en las condiciones ambientales del intestino. Hay dos tipos de factores de células T que se han implicado en la producción de respuestas IgA: la interleucina 5 y un factor que se une al fragmento Fc de las inmunoglobulinas presentes en la superficie de los linfocitos B. Los genes que codifican estos factores podrían clonarse y expresarse asociados a antígenos víricos, para estudiar su papel en la inducción de respuestas inmunes secretoras contra el VGPT.

Hay dos tipos de moléculas que podrían cooperar en la estimulación del tejido linfoide asociado al intestino mediante la ingestión oral de antígenos no autorreplicantes: la subunidad B de la toxina del cólera, y el pili de la cepa enterotóxica K88 de *E. coli*. La mayoría de los antígenos no viables son con frecuencia ineficientes, requiriéndose grandes cantidades (mg) del inmunógeno y produciendo, en el mejor de los casos, respuestas inmunológicas débiles. El toxoide del cólera es una excepción, siendo un potente inmunógeno. Esto se debe fundamentalmente a la capacidad de esta toxina para unirse fuertemente al gangliósido GM₁ en las superficies celulares, una propiedad de la subunidad B. Recientemente se ha demostrado que el toxoide del cólera tiene efectos adyuvantes potentes en ratones en respuestas inmunes intestinales a antígenos administrados oralmente. Un determinante antigénico del sitio D de la proteína S se ha expresado en zonas expuestas, como proteína de fusión con la subunidad B de la toxina del cólera. El producto recombinante indujo anticuerpos neutralizantes para el VGPT, pero su papel en protección no se ha descrito.

Una subunidad de 23 kD obtenida a partir del VGPT por sonicación, centrifugación isopícnica y filtración en gel a través de Sephadex G-200, administrada por vía intramuscular a cerdas preñadas próximas al alumbramiento, indujo protección en los lechones que se amamantaron de la cerda vacunada. Estos resultados

no han sido confirmados, y resultan sorprendentes, ya que el VGPT inactivo no producía protección cuando se inoculaba intramuscularmente. Lo más probable es que el requerimiento mínimo para que una vacuna no viva induzca protección frente al VGPT es que contenga cuatro componentes: epitopos de células B y T, componentes que dirijan el antígeno a los nodulos linfáticos del intestino, y factores que promuevan respuestas IgA.

Los intentos para desarrollar vacunas por ingeniería genética con la utilización de vectores procarióticos convencionales han fracasado. La mayor parte del gen de la proteína S se ha expresado con alto rendimiento en *E. coli*. Sin embargo, no se obtuvieron anticuerpos neutralizantes cuando se hicieron inmunizaciones subcutáneas con el producto recombinante²⁰ ni tampoco se indujo protección *in vivo*. Un estudio, que es más prometedor, también basado en el uso de vectores procarióticos, consiste en la expresión de antígenos del virus GPT en formas atenuadas de *Salmonella typhimurium*, que tiene tropismo por las placas de Peyer. Mutantes dobles de esta bacteria que tienen alterada la síntesis de cAMP y la del receptor para cAMP, persisten en los órganos linfáticos del intestino durante unas 3 semanas, e inducen inmunidad local y secretora contra antígenos propios y heterólogos, en mucosas y glándulas mamarias²¹.

Se requiere la expresión de productos recombinantes en vectores eucarióticos cuando los determinantes antigénicos del VGPT son parcial o totalmente dependientes de glicosilación, como los sitios A y B, respectivamente, los cuales son inductores de anticuerpos neutralizantes. Se pueden considerar dos tipos de vectores eucarióticos: 1) vectores para uso *in vivo*, como poxvirus, adenovirus, poliovirus, reovirus y parvovirus, o, 2) vectores como baculovirus, levaduras u hongos filamentosos para producir antígeno glicosilado *in vitro*, que posteriormente puede administrarse en forma no infecciosa. Los intentos para inmunizar contra el VGPT con vectores recombinantes VGPT-virus vacuna que expresaban la mayor parte de la proteína S, dieron como resultado la inducción de anticuerpos neutralizantes para el VGPT²⁰, pero no indujeron protección. Tres vectores vivos —adenovirus, poliovirus y reovirus— tienen la ventaja de que algunas de sus cepas infectan las placas de Peyer. Los adenovirus tienen un genoma de ADNc, lo cual facilita su uso como vectores²². Plásmidos que llevan un inserto correspondiente a un ADNc de todo el genoma de poliovirus son

capaces de generar ARN de poliovirus infeccioso e iniciar un ciclo vírico completo, una vez transfectados a células susceptibles. La manipulación de plásmidos derivados de estos virus permitiría la expresión de péptidos heterólogos en las placas de Peyer.

La exposición de proteínas del VGPT bajo el control del promotor polihedrina de baculovirus, o en hongos filamentosos (como *Aspergillus nidulans* o el sistema Mucor) puede ser una forma económica de producir grandes cantidades de antígeno glicosilado²³. Las proteínas del VGPT —S, M y N—, se han expresado usando baculovirus, pero su uso en protección no se ha descrito.

Una fuente interesante de antígeno pueden ser los anticuerpos antiidiotípicos que mimetizan el sitio A, de estructura compleja, y que es el principal inductor de anticuerpos neutralizantes para el VGPT. Además, el uso de anticuerpos como antígenos puede tener la ventaja de su adsorción en el intestino, particularmente en los primeros días tras el nacimiento. En sistemas murinos se ha mostrado la inducción de anticuerpos neutralizantes para el VGPT, inmunizando con anticuerpos antiidiotípicos porcinos generados contra un anticuerpo monoclonal murino. Estos anticuerpos neutralizaron al virus GPT *in vitro*, pero no se han descrito estudios de protección *in vivo*. Anticuerpos monoclonales antiidiotípicos de los tipos α y γ , generados contra anticuerpos monoclonales neutralizantes para el VGPT, se están ensayando en la inducción de protección *in vivo* (datos no publicados).

Agradecimiento

Este trabajo se ha realizado con financiación del CSIC, DGICYT, CEE (proyecto BAP 0464E) y la fundación Ramón Areces.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sidcell S, Wege H, Ter Meulen V. The biology of coronaviruses. *J Gen Virol*, 1983; 64: 761-776.
2. Jiménez G, Castro JM, del Pozo M, Correa I, de la Torre J, Enjuanes L. Identification of a coronavirus inducing porcine gastroenteritis in Spain, 9th Internat. Pig Vet Con 1986: 186.
3. Callebaut P, Correa I, Pensaert M, Jiménez G, Enjuanes L. Antigenic differentiation between transmissible gastroenteritis virus of swine and a related porcine respiratory coronavirus. *J Gen Virol* 1988; 69: 1.725-1.730.

4. Holmes V, Williams RK, Stephenson CB et al. Coronavirus Receptors. En: Compans RW, Helenius A, Oldstone MBA, eds. Cell biology of virus entry, replication, and pathogenesis. Alan R Liss, Nueva York, 1989; 85-94.
5. Enjuanes L, Gebauer F, Correa I et al. Location of antigenic sites of the S-glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus and their conservation in coronavirus. *Adv Exp Biol Med* 1990 (en prensa).
6. Sánchez, CM, Jiménez, G Laviada, MD et al. Antigenic homology among coronaviruses related to transmissible gastroenteritis virus. *Virology* 1989 (en prensa).
7. Jiménez G, Correa I, Melgosa MP, Bullido MJ, Enjuanes L. Critical epitopes in transmissible gastroenteritis virus neutralization. *J Virol* 1986; 60: 131-139.
8. Jiménez Wiener G. Variabilidad antigénica del virus de la gastroenteritis porcina transmisible. Tesis doctoral, 1988. Universidad de Madrid, España.
9. Suñé C, Jiménez G, Correa I, Bullido MJ, Gebauer F, Smerdou C, Enjuanes L. Mechanisms of transmissible gastroenteritis coronavirus neutralization. *Virology* 1990 (en prensa).
10. Correa I, Jiménez G, Suñé C, Bullido MJ, Enjuanes L. Antigenic structure of E2-glycoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *Virus Res* 1988; 10: 77-94.
11. Correa I, Gebauer F, Bullido MJ et al. Localización de antigenic sites of the S-glicoprotein of transmissible gastroenteritis coronavirus. *J Gen Virol* 1989 (en prensa).
12. Laude H, Delmas B, Godet M, Gelfi J, Raschaert D. Enteric coronavirus TGEV: mapping of four major antigenic determinants in the amino-terminal half of peplomer protein S. *Adv Exp Med Biol* 1990 (en prensa).
13. Wesley RD. Nucleotide sequence of the E2-peplomer protein gene and partial nucleotide sequence of the upstream polymerase gene of TGV (Miller Strain) *Adv Exp Med Biol* 1990 (en prensa).
14. Makino S, Stohman SA, Lai MMC. Leader sequences of murine coronavirus RNA can be freely reassorted: Evidence for the role of free leader RNA in transcription, *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 4.204-4.208.
15. Wesley RD, Woods RD, Correa I, Enjuanes L. Lack of protection *in vivo* with neutralizing monoclonal antibodies to transmissible gastroenteritis virus. *Vet. Microbiol* 1988; 18: 197-208.
16. Rasschaert, D, Laude H. The predicted primary structure of the peplomer protein E2 of the porcine coronavirus transmissible gastroenteritis virus. *J Gen Virol* 1987; 68: 1.883-1.890.
17. Enjuanes L, Gebauer F, Correa I, et al. Location of antigenic sites of the S-glycoprotein of transmissible gastroenteritis virus and their conservation in coronaviruses. *Adv Exp Med Biol* 1990 (en prensa).
18. Posthumus W, Meloen R, Enjuanes et al. Linear neutralizing epitopes on the peplomer protein of coronaviruses. *Adv Exp Med Biol* 1990 (en prensa).
19. Bullido MJ, Correa I, Jiménez G, Suñé C, Gebauer F, Enjuanes L. Induction of transmissible gastroenteritis coronavirus-neutralizing antibodies *in vivo* by virus-specific T helper cell hidridomas. *J Gen Virol* 1989; 70: 659-672.
20. Hu, S, Bruszewski J, Smallig R, Browne, JK. Studies of TGEV spike protein GP195 expressed in *E. coli* and by a TGE-vaccina virus recombinant. En: Immunobiology of proteins and peptides. II. Viral and bacterial antigens. Nueva York. Plenum Press, 1987: 63-82.
21. Curtiss, R, Goldschmidt, R, Pastian, R, Lyons, M, Michalek, Sm, Mestecky, L. Cloning virulence determinants from *S. mutants* and the use of recombinant clones to construct bivalent oral vaccine strains to confer protective immunity against *S. mutants*- induced dental caries. En: Hamada S, ed. Molecular microbiology and immunobiology of *Streptococcus mutants*, Elsevier, Sc Pub. Nueva York. 1986.
22. Prevec L, Schneider M, Rosenthal KL, Belbeck LW, Derbyshire JB, Graham FL. Use of human Adneovirus-based vectors for antigen expression in animals. *J Gen Virol* 1990; 70: 429-434.
23. Van Brunt J. Fungi: the perfect host? *Biotechnology* 1986; 12: 1.057.

DISCUSIÓN

- M. FRESNO: Es bien sabido que en el reconocimiento de los linfocitos T, el péptido identificado en el epítipo está asociado al complejo principal de histocompatibilidad. Teniendo en cuenta que el complejo principal de histocompatibilidad es polimórfico y varía de especie a especie, ¿cómo podría solventarse este problema de epítipo T en los diseños de vacunas sintéticas?
- L. ENJUANES: Efectivamente hay determinantes antigénicos para los linfocitos T, que solamen-

te son reconocidos en el contexto de determinados antígenos de histocompatibilidad de clase I o de clase II siendo además específico para cada especie. Sin embargo, hay otros que parece que tienen una mayor universalidad. Por ejemplo, se han seleccionado en parásitos determinados péptidos que estimulan preferentemente a los linfocitos T. Respondiendo concretamente a su pregunta, hay dos formas de solucionar el problema: 1) identificar estos epítipos T, digamos universales, a

- través de las especies, y 2) no limitarse a un solo epítipo T, sino utilizar varios para cubrir el repertorio de haplotipos más frecuentes de forma que una gran parte de la población pueda responder a este epítipo en concreto.
- M. FRESNO: Una segunda cuestión relacionada también con esto. Recientemente se ha descrito que las células T cooperadoras pueden subdividirse según la función o según la secreción de linfoquinas. Hay algunas linfoquinas realmente implicadas en el caso particular de la inmunidad intestinal en la secreción de IgA. De cara a identificar epítipos T en un futuro, ¿están pensando en un método para buscar epítipos capaces de inducir este tipo particular de células T relacionadas con las interleuquinas implicadas en la inducción de IgA?
- L. ENJUANES: Efectivamente, parece que una de las que tiene más posibilidades es la IL-5 aunque los datos no son nada espectaculares. A nosotros nos gustaría entrar en este campo, pero por el momento lo único que sabemos es que los epítipos que tenemos son capaces de inducir IL-2, y muy posiblemente IL-4. Esto lo hemos podido averiguar porque disponemos de anticuerpos monoclonales específicos para esas dos interleuquinas. Esperamos disponer de anticuerpos monoclonales específicos para la IL-5 en un futuro inmediato.
- J. ORTIN: En relación con estas genotecas de mimótopos que ha mencionado, ¿se sabe si uno de estos recombinantes, con una secuencia concreta en la zona de enlace, puede ser inmunogénico en el sentido de tener una función similar a la que podría ejercer un anticuerpo antiidiotípico?
- L. ENJUANES: El único recombinante que disponemos que es realmente un mimótopo, mimetiza el sitio B, y es capaz de inducir anticuerpos que reconocen a la partícula vírica. Lo que sucede en el caso particular del sitio B es que la zona que nosotros hemos detectado no induce anticuerpos neutralizantes, pero estoy de acuerdo en que pueden ser inmunogénicos en el sentido de que inducen anticuerpos que reconocen la partícula B.
- J. ORTIN: ¿Esto es general o se refiere a los actualmente conocidos?
- L. ENJUANES: Este hallazgo es bastante reciente y se dispone de muy pocos datos. Realmente no puedo contestar a su pregunta.
- R. LLOPIS: Nosotros estamos trabajando en un sistema quizás menos complicado que el suyo, pero me interesaría comparar los datos, ¿qué proporción de anticuerpos ensayados con el epítipo *scanning* son capaces de reconocer los nonapéptidos?
- L. ENJUANES: Aproximadamente una tercera parte de los anticuerpos ensayados han respondido. Naturalmente, es un tipo de tecnología que solamente es útil para los determinantes lineales, a no ser que uno tenga la suerte de que aparezca una correactividad. Es decir, una diferencia fundamental entre la técnica del epítipo *scanning* y la técnica de las genotecas al azar es que en el epítipo *scanning*, los nonapéptidos o decapeptidos que se presentan al anticuerpo se han obtenido a partir de la secuencia del virus. Por ello, si son determinantes lineales, las probabilidades de éxito son muy grandes.
- R. LLOPIS: Nosotros encontramos aproximadamente 1/6, y ustedes 1/3. Está dentro de un rango. La segunda cuestión a esclarecer es si los nonapéptidos que ustedes identifican y que reconocen los anticuerpos monoclonales son capaces de competir por el enlace del anticuerpo monoclonal a la proteína nativa o al virus.
- L. ENJUANES: No hemos realizado el experimento de sintetizar estos nonapéptidos y ver la competición, aunque mi opinión es que en casos como el del sitio C es casi seguro que sí, ya que son sitios realmente lineales y absolutamente independientes de conformación. De hecho, cuanto mayor es la desnaturalización del virus más fácilmente es reconocido. Por tanto, si el anticuerpo monoclonal ha sido capaz de reconocer al nonapéptido en el pocillo de una placa, no veo por qué no lo puede reconocer también en solución.
- R. LLOPIS: Nosotros hemos encontrado bastantes problemas en esta competición, aunque obviamente es un sistema distinto. La última cuestión que quisiera plantearle es: todo el mapa antigénico original que han diseñado para establecer de alguna forma las posiciones relativas de enlace de unos monoclonales con respecto a otros, se basa, si he comprendido bien, en ensayos competitivos donde un anticuerpo monoclonal desplaza el enlace del otro. En aquellos casos donde no existe una caída de señal, ¿han observado si estos monoclonales pueden unirse simultáneamente?
- L. ENJUANES: Bueno, de hecho esto forma parte del propio virus. Para realizar este tipo de ensayos, nosotros seleccionamos 21, 22 anticuerpos monoclonales y analizamos todas las posibles combinaciones binarias entre ellos, y además en los dos órdenes, poniendo pri-

mero A y luego B, o bien poniendo B primero y luego A.

R. LLOPIS: ¿Pero siempre en el ensayo competitivo?

L. ENJUANES: En todos los casos, es decir, que se ensayaron todas las combinaciones posibles.

R. LLOPIS: Quizás me he expresado mal, yo me refería a si interpretan la ausencia de desplazamiento de señal como evidencia de que los dos monoclonales se van a sitios diferentes.

L. ENJUANES: Esa es la conclusión a la que llegamos normalmente cuando se ha ensayado en las dos direcciones, porque a veces la ausencia de desplazamiento puede deberse a una menor afinidad de uno de los dos anticuerpos monoclonales, que simplemente no desplaza al otro porque tiene menos afinidad, aunque este método tampoco tiene una fiabilidad del 100 %.

R. LLOPIS: Es que nosotros hemos identificado, y en este sentido he formulado la pregunta, parejas de anticuerpos monoclonales incapaces de unirse simultáneamente a la hormona, o en su caso sería al virus, en un ensayo tipo sandwich, sin que en el ensayo competitivo hayan demostrado desplazamiento o caída de señal.

L. ENJUANES: Efectivamente, en estos casos no sabemos exactamente qué sucede. Podría ser, como ha observado la Dra. Correa en su laboratorio, que el antígeno cambiara completamente. Esto es especialmente claro para algunos epítomos en el caso concreto del sitio C. En mi intervención resalté que habíamos determinado la estructura funcional, la cual está definida sobre la base de un ensayo. Resulta claro que el resultado puede variar según el ensayo, ya que puede variar la conformación.

J. PIULATS: Quisiera volver al punto del control de isotipos. Quería saber su opinión sobre si este control en la modulación del isotipo mediante linfoquinas puede aceptarse como un aspecto general o bien tan sólo es válido cuando se trata con modelos experimentales, como el modelo murino.

L. ENJUANES: A pesar de la gran cantidad de literatura publicada al respecto, los resultados son un tanto decepcionantes, ya que los niveles de aumento, que se obtienen por ejemplo con IL-5, son del orden de dos a tres veces. Normalmente, para obtener incrementos de diez veces, que ya tendrían interés, hay que recurrir a la combinación de más de una interleuquina, y esto son arenas movedizas.

Creo que todavía queda mucho por investigar en este terreno.

E. CERDÁ: Como yo no soy inmunólogo, la historia de los mimótopos me resulta curiosa. Me recuerda el caso de los falsos Rembrants, que engañaron a los críticos y que llegaron a considerarlos durante mucho tiempo mejores que los originales. Da la sensación de que el objetivo es buscar mimótopos que sean mejores que los epítomos naturales, y que puedan proporcionar mejores vacunas. La primera pregunta sería entonces, ¿con qué frecuencia ocurre esto? Y la segunda sería, ¿qué esperanza hay de que los mimótopos, por buenos que sean, resistan la crítica científica en un futuro, es decir, resistan la evolución genética del virus? Según mi información, la variabilidad del virus es el principal problema que plantean las vacunas. Entonces, ¿no sería mejor fijarse en los epítomos comunes a muchos virus, algunos de los cuales parecen muy estables? Me gustaría saber cuál es la estrategia que se sigue desde el punto de vista práctico.

L. ENJUANES: Desde un punto de vista práctico la estrategia que estamos siguiendo es precisamente la que usted sugiere. Se han analizado virus entéricos aislados en tres continentes a lo largo de los últimos 40 años, identificándose un subsitio antigénico común a todos ellos. En las variantes respiratorias que producen otra patología distinta, en virus felinos, en virus caninos, siempre buscamos un determinante antigénico de alto interés conservado a lo largo del tiempo, incluso entre virus que infectan distintas especies.

E. CERDÁ: Entonces no entiendo qué sentido tiene substituir un epítomo que se conserva bien histórica y geográficamente por un mimótopo que en teoría puede variar.

L. ENJUANES: Quisiera aclarar este punto. El epítomo es una zona del virus que en principio se conserva, al menos en algunos casos como los anteriormente citados. El mimótopo es una secuencia sintética que puede utilizarse como instrumento para conseguir una respuesta contra el virus, aun en el caso de que el virus experimente cambios, el mimótopo no varía.

D. BLOXHAM: Desde el punto de vista industrial, recientemente existe un considerable interés en la posibilidad de desarrollar nuevos antiviricos mediante la aproximación de identificar secuencias descritas y su interacción con receptores celulares. ¿Qué opina de las dos posibilidades, vacunas en comparación con bloqueantes de la entrada de virus celulares?

L. ENJUANES: Está claro que éste es un abordaje en principio interesante. La afinidad de un anticuerpo monoclonal por una partícula vírica alcanza en el mejor de los casos valores de 10^9 . Sin embargo, la afinidad de un receptor celular por un virus, que es lo que se pretende bloquear con uno de estos fármacos que mimetizan estas zonas, es más elevada. Así, para conseguir un fármaco antivírico de este tipo, cuyo mecanismo de acción se base en el bloqueo de la unión de un virus al receptor celular, deberá afinarse muy bien en el diseño para bloquear esa afinidad muy superior a la de un anticuerpo de muy buena calidad. Si fuera posible conseguirlo, creo que tendría éxito. Sin embargo, yo no confiaría mucho en ese tipo de tecnología por una razón, que se deriva muy claramente del estudio del mecanismo de neutralización de los virus. Este enfoque implicaría, por ejemplo, neutralizar un virus, basándose en un bloqueo de todos

los receptores celulares capaces de reconocer ese virus, teniendo en cuenta que se trata de un receptor con una afinidad de 10^{11} , lo que supondría añadir unas concentraciones elevadísimas de ese péptido, que muy probablemente serían tóxicas para el organismo.

E. MENDEZ: En todos estos aspectos que estamos abordando, siempre se está considerando los anticuerpos monoclonales, la localización de sitios muy concretos en la cadena polipeptídica, péptidos, aminoácidos, etc. ¿No puede estar la clave de todo esto realmente en que el sitio de reconocimiento de estas moléculas sea a nivel de estructura terciaria o secundaria?

L. ENJUANES: Por supuesto, estoy absolutamente de acuerdo. Es obvio que hay mutaciones que afectan a un extremo distal de la molécula, y que, sin embargo, alteran su conformación y, por tanto, afectan a la unión.