

Propiedades inmunológicas de proteínas de fusión derivadas del virus de la Fiebre Aftosa expresadas en la superficie de Baculovirus y células de insectos.

Oscar Taboga ¹., Cecilia Tami, ¹., Elisa Carrillo, ^{1,2}., Analía Berinstein^{1,2} y Eduardo L. Palma ^{1,2,3}.

¹Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Cautelar. ²CONICET. ³Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria

Resumen¹

Hasta el presente, se han utilizado diferentes estrategias en el desarrollo de vacunas a subunidades contra el virus de la Fiebre Aftosa (VFA) con éxito variable. Estas estrategias, basadas en la técnicas de ADN recombinante o síntesis química para su obtención, utilizan diferentes proteínas virales, como son las proteínas de la cápside viral o el precursor P1, la fusión de sitios antigénicos de la proteína VP1 a proteínas transportadoras y el uso de péptidos sintéticos correspondientes al sitio antigénico principal localizado en el "loop" GH de VP1 (26, 27).

Usando la estrategia de expresión de secuencias foráneas sobre la superficie de Baculovirus (*virus de insectos*) se construyeron virus recombinantes que presentan antígenos derivados del VFA serotipo C como proteínas de fusión con la glicoproteína gP64. Las proteínas de fusión VFA-gP64 pudieron expresarse con alta eficiencia en células de insecto Sf9. La tinción inmunofluorescente mostró la localización de las proteínas quiméricas en la membrana de las células Sf9 infectadas, permitiendo la accesibilidad de los anticuerpos a las secuencias foráneas. Además, la detección de proteínas recombinantes en los sobrenadantes de infección sugiere que éstas se localizan en la superficie de los Baculovirus. La unión de los diferentes anticuerpos monoclonales a los Baculovirus recombinantes sugiere que los epitopos insertados están expuestos sobre la superficie de la partícula viral.

Los antígenos del VFA expresados sobre los Baculovirus y las células infectadas indujeron una respuesta inmune fuerte y específica al virus, aún en ausencia de adyuvantes. Los sueros de los animales vacunados con los Baculovirus recombinantes conteniendo el sitio A (principal sitio antigénico del serotipo C) presentan una respuesta inmune específica, determinada en ensayos de ELISA, y fueron capaces de neutralizar la infecciosidad viral *in vitro*. Los

¹ Los resultados del presente trabajo dieron origen a dos publicaciones: Archives in Virology: 145, 1815-28 (2000) y Vaccine 18: 2231-2238 (2004).

² El presente trabajo pudo realizarse por el financiamiento recibido de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT N° 08-03515).

animales vacunados con estas construcciones fueron protegidos frente al desafío con virus homólogo. Sin embargo, las células de insecto infectadas y los Baculovirus que expresan la fusión P1-gP64 sólo presentan una débil respuesta y no confieren protección. La respuesta disminuida puede deberse a la conformación espacial de la poliproteína P1 expresada en el contexto de la proteína gP64, haciendo que los epitopos del sitio A contenidos en P1 sean menos accesibles al reconocimiento del sistema inmune. A pesar de su baja inmunogenicidad, los altos niveles de expresión demuestran la capacidad del sistema de expresar proteínas foráneas de gran tamaño como son las fusiones con la proteína gP64.

La investigación de proteínas transportadoras multiméricas basada en partículas autoensamblantes ha despertado un considerable interés en el campo de la "vacunología". Sin embargo, aún es necesario demostrar que un sistema particulado presenta ventajas sobre las proteínas transportadoras no multiméricas (por ejemplo, la proteína KLH, comúnmente utilizada en éste tipo de ensayos). En este trabajo se introduce una nueva metodología de presentación al sistema inmune de antígenos solubles en forma multimérica. Esta estrategia permitió superar problemas asociados con la toxicidad de los productos recombinantes expresados en bacterias, pérdida de multimerización de partículas tipo "core" [(como por ejemplo la proteína "core" del virus de la hepatitis B (HBc)] y restricciones en el tamaño de los sitios antigénicos que pueden ser expresados.

En ratones inmunizados con el antígeno HBc-sitio A no se detectaron anticuerpos contra el VFA tanto en ensayos de ELISA como en ensayos de reducción del número de placas, a pesar de la presencia de fuertes epitopos T en la molécula monomérica HBcAg. Sin embargo, cantidades equivalentes del mismo epitopo sobre la superficie de Baculovirus indujeron niveles comparables de anticuerpos neutralizantes a los inducidos por el VFA inactivado (vacuna comercial), mostrando que múltiples epitopos lineales presentados en este sistema adquieren una conformación favorable para la inducción de anticuerpos neutralizantes asociados con protección. La incorporación de proteínas de fusión VFA-gP64 a la superficie de los baculovirus parece estar menos restringida por la conformación de la proteína quimérica que la incorporación a las partículas tipo *core*, mostrando que éste sistema puede ser más flexible.

Otra consideración importante es que éste sistema de presentación antigénica no requiere la inclusión de adyuvantes para inducir una respuesta inmune protectora.

En conclusión, en este trabajo se demuestra que es posible mejorar la inmunogenicidad de sitios antigénicos simples expresándolos sobre las membranas de células Sf9 o sobre la superficie de Baculovirus en ausencia de adyuvantes. Este hecho hace de este novedoso sistema de presentación antigénica un método útil y seguro para el desarrollo de vacunas.²
