

GARAY, Ernesto S.<sup>a, b</sup>; FONTANA, Diego S.<sup>a, b</sup>; KRATJE, Ricardo B.<sup>a</sup>; PRIETO, Claudio C.<sup>b</sup>

a) UNL, CONICET, FBCB (Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas), CBL (Centro Biotecnológico del Litoral), Laboratorio de Cultivos Celulares, Santa Fe, Argentina .

b) UNL, FBCB (Fac. Bioquímica y Cs. Biológicas), CBL (Centro Biotecnológico del Litoral), Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico, Santa Fe, Argentina .

egaray@fbc.unl.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

Las partículas pseudovirales (VLPs) son estructuras autoensamblables altamente inmunogénicas constituidas por proteínas virales que pueden ser modificadas para generar respuestas inmunes hacia epítopes heterólogos, denominándose éstas últimas VLPs quiméricas. En nuestro laboratorio contamos con una plataforma de generación de VLPs del virus de la Rabia (RV-VLPs) mediante expresión de la glicoproteína G de la misma (RVG) en células HEK293 (Fig. 1).

Las ventajas que posee ésta plataforma como vacuna de nueva generación podrían ser aprovechadas para generar respuestas inmunes hacia otros virus como el de la fiebre aftosa (FMDV) mediante fusión de epítopes a la RVG y su expresión en el contexto de la RV-VLP.

## OBJETIVO

Diseñar y generar VLPs quiméricas del virus de la rabia utilizando como antígeno heterólogo modelo un epítipo neutralizante (FMDV) denominado *loop G-H*.

## METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Se identificaron sitios apropiados para insertar la secuencia heteróloga de FMDV, denominada **loop G-H** (21 AA), mediante un análisis bioinformático, localizando regiones expuestas en la superficie de RVG y estructuralmente flexibles (Fig. 2). Se eligieron 3 sitios denominados S0, S1 y SII y se generaron 3 variantes de la proteína de fusión de RVG con la secuencia **loop G-H** en cada sitio (Fig. 3).

## CONCLUSIONES

Los sitios de inserción identificados permitieron exponer el epítipo heterólogo en la superficie de VLPs en una conformación antigénica correcta, al ser identificado en cada una de las variantes por anticuerpos específicos hacia el mismo. Éstos resultados sientan la base para la generación de una nueva plataforma de presentación antigénica con fines vacunales basadas en VLPs del virus de la rabia.

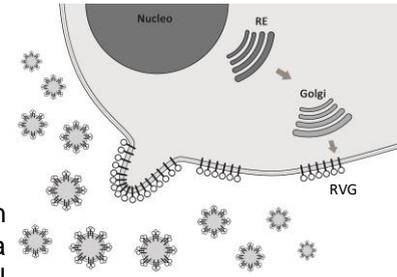


Figura 1. Representación esquemática de la expresión de RV-VLPs

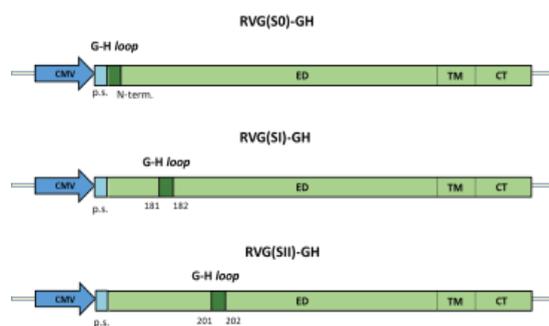


Figura 3. Representación esquemática de las proteínas de fusión diseñadas.

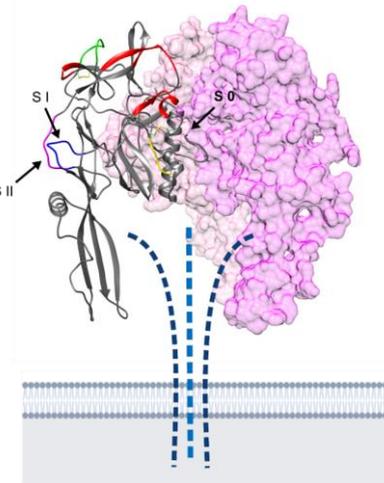


Figura 2. Modelo 3D del trímero de RVG

Posteriormente, se expresaron dichas proteínas en células HEK293 y se comprobó su correcta localización en la membrana plasmática por inmunomarcación con anticuerpos anti-RVG, mediante microscopía láser confocal (Fig. 4) y citometría de flujo (Fig. 5). A su vez, se comprobó que el epítipo heterólogo se encuentra expuesto y con una conformación antigénica correcta al ser reconocido por anticuerpos específicos anti-FMDV.

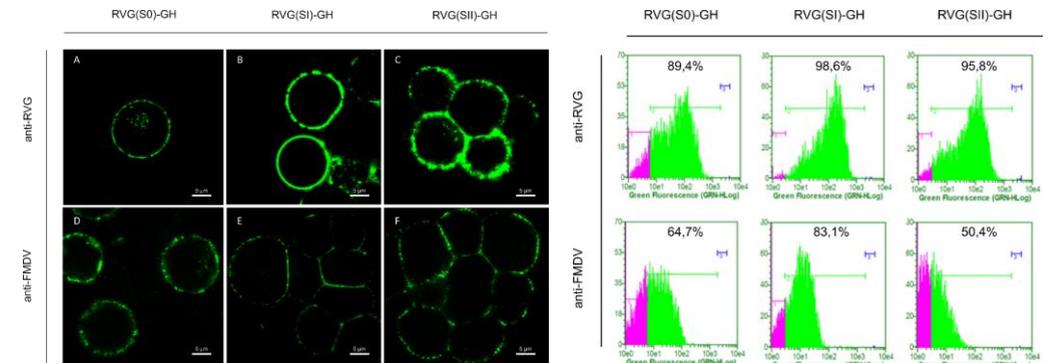


Figura 4. Microscopía láser confocal

Figura 5. Citometría de flujo

Finalmente, se verificó por ELISA sándwich específico hacia RVG y FMDV, la formación de VLPs en el sobrenadante de cultivo de las variantes diseñadas (Fig. 6), verificando a su vez que el epítipo heterólogo se encuentra expuesto en la superficie de las partículas.

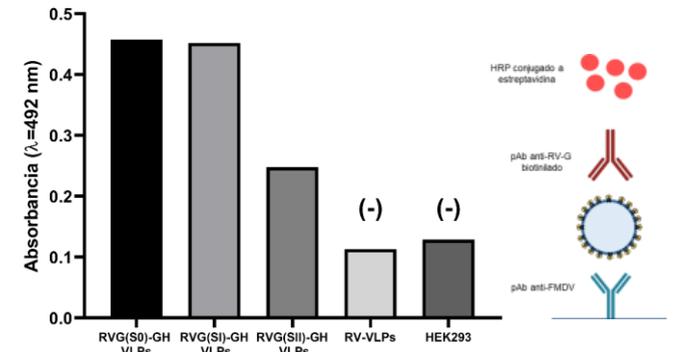


Figura 6. Análisis de la expresión de VLPs quiméricas por ELISA