

Tesis de Posgrado

Expresión de antígenos derivados del virus de la fiebre aftosa en diferentes sistemas eucarióticos

Taboga, Oscar A.

2000

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Taboga, Oscar A.. (2000). Expresión de antígenos derivados del virus de la fiebre aftosa en diferentes sistemas eucarióticos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3255_Taboga.pdf

Cita tipo Chicago:

Taboga, Oscar A.. "Expresión de antígenos derivados del virus de la fiebre aftosa en diferentes sistemas eucarióticos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3255_Taboga.pdf

EXACTAS UBA

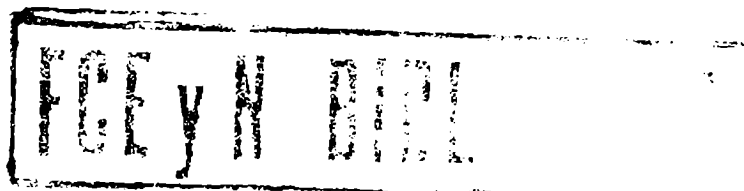
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**Expresión de antígenos derivados del virus
de la fiebre aftosa en diferentes sistemas
eucarióticos**

**Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en
Ciencias Biológicas**

Lic. Oscar A. Taboga

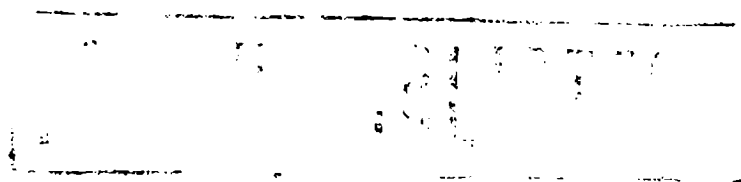
Director: Dr. Eduardo L. Palma

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

2000



University of Buenos Aires
School of Sciences



**Expression of antigens derived from foot-
and-mouth disease virus in different
eukaryotic systems**

Thesis presented to obtain the PhD degree

Author: Lic. Oscar A. Taboga

Director: Dr. Eduardo L. Palma

Institute of Biotechnology, CICVyA, INTA Castelar

2000



ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCION: ACTUALIZACIÓN BIBLIOGRAFICA	
1. La fiebre aftosa	9
2. El virus de la fiebre aftosa	11
3. Características antigénicas del VFA	15
4. La respuesta inmune contra el VFA	17
5. La vacunación como herramienta de prevención	19
6. Los baculovirus como sistema de expresión	25
7. Las partículas quiméricas semejantes a virus	29
II. HIPÓTESIS	36
III. OBJETIVOS	37
IV. MATERIALES Y METODOS	
1. Oligonucleótidos	38
2. Cepas bacterianas	38
3. Virus	39
4. Células	39
5. Animales de laboratorio	39
6. Anticuerpos monoclonales	40
7. Metodología del ADN recombinante	40
7.1. Preparación de ADN plasmídico de alta calidad	41
7.2. Digestión con enzimas de restricción	41
7.3. Obtención de extremos 5´ romos	41
7.4. Defosforilación de los extremos 5´fosfato	41

7.5. Electroforesis en geles de agarosa	42
7.6. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	42
7.7. Reacciones de ligado molecular	42
7.8. Marcación radioactiva de sondas	42
7.9. Transformación de bacterias	43
7.10. Minipreparaciones de ADN	43
8. Secuenciación de ADN	44
9. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	45
10. Tinción con el colorante azul de Coomassie	45
11. Identificación de proteínas mediante <i>Western blot</i>	
11.1. Electrotransferencia	46
11.2. Detección inmunológica de las proteínas	46
12. Construcción de los plásmidos de transferencia para baculovirus	
12.1. Construcción del plásmido pVLcore	47
12.2. Construcción del plásmido pVLcore-A	47
12.3. Construcción del plásmido pVLP1Mir	48
12.4. Construcción del plásmido pVLP1Mir-2A	50
12.5. Construcción del plásmido pVLSig	51
12.6. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupI	51
12.7. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupA	52
12.8. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupP1	53
13. Obtención de baculovirus recombinantes por cotransfección	53
14. Clonado viral	54
15. <i>Dot-blot</i> de ADN	54
16. Amplificación de <i>stocks</i> virales	54
17. Titulación de <i>stocks</i> virales	55
18. Expresión de proteínas recombinantes	55
19. Cuantificación de proteínas	56
20. Fraccionamiento de proteínas por gradientes de sacarosa	56
21. Fraccionamiento de baculovirus mediante gradientes de sacarosa	56
22. Inmunofluorescencia de células infectadas	57
23. Formulación de vacunas	57
24. Vacunación de ratones	52
25. Evaluación de la respuesta inmune	58

V. RESULTADOS	61
1. Construcción del plásmido de transferencia pVLP1Mir	63
2. Construcción del plásmido de transferencia pVLP1Mir-2A	65
3. Construcción del plásmido de transferencia pVL <i>core</i>	67
4. Construcción del plásmido de transferencia pVL <i>core-A</i>	68
5. Obtención de los baculovirus recombinantes	70
6. Expresión de las proteínas recombinantes <i>core</i> y <i>core-A</i>	71
7. Evaluación de la cinética de expresión de las proteínas recombinantes <i>core</i> y <i>core-A</i>	72
8. Expresión de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A	73
9. Evaluación de la cinética de expresión de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A	75
10. Evaluación de la particulación de las proteínas recombinantes <i>core</i> y <i>core-A</i>	76
11. Evaluación de la conformación adoptada de las proteínas precursoras P1Mir y P1Mir-2A	79
12. Inmunogenicidad de las proteínas expresadas en el sistema "baculovirus-células de insecto"	
12.1. Inmunogenicidad de las partículas <i>core/core-A</i>	80
12.2. Inmunogenicidad de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A	81
13. Expresión de proteínas derivadas del VFA en la superficie de baculovirus y de células de insecto	83
14. Construcción del plásmido universal pVLSupI	83
15. Construcción del plásmido pVLSupA	85
16. Construcción del plásmido pVLSupP1	86
17. Obtención de los baculovirus recombinantes Acgp64, AcSupA y AcSupP1	88
18. Expresión de las proteínas de fusión con gp64	88
19. Detección de las proteínas recombinantes en la membrana de células de insecto	91
20. Detección de las proteínas recombinantes en la superficie de los baculovirus recombinantes	93

21. Propiedades antigénicas de los baculovirus que expresan las fusiones VFA-gp64	94
22. Propiedades inmunogénicas de los baculovirus que expresan las fusiones VFA-gp64 y de células infectadas con éstos	95
VI. DISCUSION	104
1. Expresión de sitios antigénicos derivados del VFA en <i>E. coli</i> y levaduras	106
2. Expresión de sitios antigénicos derivados del VFA en el sistema “ baculovirus-células de insecto”	108
3. Expresión de sitios antigénicos derivados del VFA en la superficie de baculovirus y en la membrana de células de insecto infectadas	113
4. Inmunogenicidad de los antígenos derivados del VFA expresados en la superficie de células infectadas	115
5. Inmunogenicidad de los antígenos derivados del VFA expresados en la superficie baculovirus	117
6. Consideraciones finales	119
VII. CONCLUSIONES	123
VIII. BIBLIOGRAFÍA	127

ABREVIATURAS

AcNPV	virus de la poliedrosis nuclear <i>Autographa californica</i>
ADN pol I	ADN polimerasa I
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
APS	persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	seroalbúmina bovina
BTV	virus de la lengua azul
BV	virus brotado
CIP	fosfatasa alcalina de timo de ternera
cm	centímetros
DLRL	dosis letales para ratón lactante
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DTT	ditiotreitól
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
FA	fiebre aftosa
GELAB	Gerencia de Laboratorios
h	horas
HPV	papilomavirus humano
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
kDa	kilodálton
M	molar
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
ng	nanogramos
NP40	nonidet-P40
°C	grados Celsius
OV	virus ocluido
pb	pares de bases

PBS	<i>buffer</i> fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PFA	paraformaldehído
RT	transcriptasa reversa
SDS	dodecil sulfato de sodio
SENASA	Servicio Nacional de Sanidad Animal
SMC	sitio múltiple de clonado
T7 ADN pol	ADN polimerasa del fago T7
Taq	Taq ADN polimerasa
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
TrpE	antranilato sintetasa
U	unidades
ufp	unidades formadoras de playas de lisis
V	voltios
VFA	virus de la fiebre aftosa
VHB	virus de la hepatitis B
VLP	<i>virus-like particles</i> , partículas semejantes a virus
μ Ci	microCurie
μ g	microgramos
μ l	microlitros
[³² P] α -dCTP	citidina trifosfato marcada radioactivamente en el átomo de fósforo α

EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DERIVADOS DEL VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA EN DIFERENTES SISTEMAS EUCARIÓTICOS.

RESUMEN

La fiebre aftosa es una enfermedad de gran importancia económica que afecta principalmente al ganado bovino. Esta enfermedad está causada por un picornavirus, el virus de la fiebre aftosa (VFA). El control de la enfermedad se lleva a cabo mediante eliminación de los animales infectados y vacunación con vacunas basadas en virus inactivado. Existen varias desventajas relacionadas con la producción y el uso de tales vacunas, entre las que están la reintroducción de la enfermedad debida a la manipulación de grandes masas virales o a la incorrecta inactivación del virus, por lo que el desarrollo de vacunas recombinantes más seguras aparece como una alternativa de gran interés. En el presente trabajo se estudió la posibilidad de expresar sitios antigénicos simples y complejos derivados del VFA en diferentes sistemas de expresión. La poliproteína P1, precursora de las proteínas estructurales del virus, pudo expresarse con éxito en un sistema bacteriano y en el sistema "baculovirus-células de insecto". Sin embargo, las diferentes versiones de esta proteína no fueron capaces de montar una respuesta efectiva contra el VFA, probablemente debido a un incorrecto plegamiento espacial. Por otro lado, el sitio antigénico inmunodominante (sitio A) presente en el *loop* V-H de la proteína VP1 se expresó con éxito como fusión a la proteína transportadora core del virus de la hepatitis B (VHB) en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes. Esta proteína quimérica no adoptó la estructura multimérica esperada, la que se consiguió mediante coinfecciones con un baculovirus que expresaba la proteína core. De todos modos, las partículas obtenidas resultaron pobres inmunógenos cuando se inyectaron en animales experimentales, hecho debido probablemente a la baja densidad de epitopes derivados del VFA en las preparaciones vacunales.

Finalmente, tanto el sitio A como la poliproteína P1 pudieron expresarse como fusión a la glicoproteína gp64 del baculovirus AcNPV. Estas proteínas quiméricas se localizaron tanto en la membrana de células infectadas como en la superficie de los baculovirus recombinantes.

Esta localización asegura una conformación particulada sobre un soporte fosfolipídico (características relacionadas con el aumento de inmunogenicidad de sitios antigénicos) y facilita la purificación de los inmunógenos. Cuando se vacunaron ratones con estas construcciones, los baculovirus llevando el sitio A y las células infectadas con éstos despertaron una respuesta inmune humoral neutralizante contra el VFA, aún en ausencia de adyuvantes. De nuevo, las construcciones llevando P1 fallaron para montar una respuesta inmune humoral neutralizante, probablemente debido a un incorrecto plegamiento espacial.

La posibilidad de producir baculovirus recombinantes y células infectadas que lleven en sus superficies sitios antigénicos derivados de patógenos de interés veterinario mediante infección de larvas puede convertirse en una manera sencilla y económica de producción de vacunas de nueva generación.

Palabras clave: Fiebre aftosa, vacunas recombinantes, sistemas de expresión eucarióticos.

EXPRESSION OF ANTIGENS DERIVED FROM FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN DIFFERENT EUKARYOTIC SYSTEMS

ABSTRACT

Foot-and-mouth disease (FMD) is an economically very important disease of cattle and other farm animals. It is caused by a picornavirus, foot-and-mouth disease virus (FMDV). The control is achieved by slaughter of infected and contact animals and systematic vaccination with inactivated virus-based vaccines.

Although these vaccines have been effective in controlling the disease, there are a number of concerns about their production and use, such as the risk of reintroduction of the disease by handling of infectious virus or incomplete inactivation of the antigen. These disadvantages have led to efforts to develop safer recombinant vaccines using genetic engineering.

In the present work, the possibility of expressing simple and complex antigenic sites from FMDV in different expression systems has been assessed. P1 polyprotein, the precursor of the four capsid proteins, has been successfully expressed in bacteria and insect cells. However, different versions of this protein failed to elicit a protective immune response to FMDV, probably due to an incorrect folding of the protein. On the other hand, immunodominant site A, located at the G-H loop of VP1, was successfully expressed as a fusion protein with the core protein of hepatitis B virus (HBV) in the baculovirus system. However, this chimaeric protein failed to adopt the expected multimeric conformation. Interestingly, multimeric particles were obtained by coinfections with a recombinant baculovirus expressing the wild type core protein, but the hybrid core particles obtained resulted poor immunogens in mice, probably due to low FMDV epitope density present in the particles.

Finally, both site A and P1 polyprotein could be expressed as fusion proteins with baculoviral glycoprotein gp64 of baculovirus AcNPV. These chimaeric proteins localized in the membrane of the infected insect cells as well as onto the surface of recombinant baculoviruses. This localization ensures a particulate conformation on a phospholipidic layer (both characteristics related to an increase of immunogenicity of simple antigenic sites) and facilitates the purification of immunogens. Experimental mice inoculated with gp-site A fusion protein expressed both in the surface of recombinant baculoviruses or in the membrane of infected cells elicited a specific humoral immune response with neutralizing activity against FMDV, even in the absence of adjuvants. Similar constructions bearing gp-P1 fusions failed to elicit a humoral immune response with neutralizing activity when inoculated in mice.

The expression of antigens from veterinary pathogens with economic importance on the surface of baculovirus and infected cells by infecting insect larvae could be an alternative, safe method to reduce the costs of this kind of vaccines.

Key words: Foot-and-mouth disease, recombinant vaccines, eukaryotic expression systems

I. Introducción

1. La fiebre aftosa

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad muy contagiosa que afecta animales de pezuña partida, principalmente bovinos y porcinos (Pereyra, 1981), Sin embargo, su rango de huéspedes naturales es muy amplio e incluye a más de treinta especies, entre las que se cuentan los ovinos, caprinos y ciervos (Forman *et al.*, 1974).

La fiebre aftosa fue descrita por primera vez en 1564 por Fracastorius y continúa siendo una de las enfermedades con mayor incidencia económica en el mundo, afectando vastas regiones de Sudamérica, Africa y Asia.

Mediante la técnica de fijación de complemento se establecieron siete serotipos virales diferentes: los tipos A, O y C son los más distribuidos en el mundo, los tipos SAT 1, 2 y 3 se encuentran en Africa y el tipo Asia 1 en el Oriente medio y sur de Asia (Brooksby, 1982). A su vez, incluidos en estos siete serotipos existen cerca de sesenta y siete subtipos (Bachrach, 1977), cada uno de los cuales agrupa cientos de cepas.

La fiebre aftosa se caracteriza por producir lesiones vesiculares (aftas) en las mucosas y en ciertos epitelios (Tymoney *et al.*, 1988), principalmente en las mucosas de la nariz y la boca y en las pezuñas y glándulas mamarias. La aparición de estas vesículas hace dificultosa la alimentación y el traslado de los animales afectados (Shahan, 1962). Luego de penetrar por vía respiratoria o a través de epitelios, el virus replica rápidamente en las células epiteliales del punto de entrada (boca, piel, laringe), dando lugar a la formación de una vesícula o afta primaria. A los tres o cuatro días, el virus pasa al torrente sanguíneo ocasionando viremia, y de esta forma se distribuye por todo el organismo alcanzando otros epitelios y provocando la aparición de aftas secundarias. Durante uno a tres días antes y siete y catorce días después de la aparición de lesiones se encuentran altos niveles de virus en todas las secreciones, así como también en los aerosoles derivados de los conductos respiratorios. La transmisión tiene lugar después de un contacto físico o cercano entre animales con infección aguda y animales susceptibles. Con menor frecuencia, el virus se difunde mecánicamente por vía de productos animales contaminados, vehículos o personas (Thomson, 1996).

En individuos jóvenes, la infección viral puede producir miocarditis y elevar la tasa de mortalidad a valores de hasta el 50% de los animales infectados. La mortalidad en adultos no sobrepasa en general el 5% y la evolución es mayormente benigna,

con pocas secuelas y regeneración de los epitelios dañados. Sin embargo, puede producirse en ocasiones una infección persistente en la que es posible recuperar virus infeccioso a partir de diversos fluidos orgánicos por largos períodos de tiempo. Los animales portadores representan un reservorio natural de virus debido a la permanencia del mismo en la faringe (Van Bekkum *et al.*, 1959, Thomson, 1996).

A pesar de que la fiebre aftosa presenta bajos índices de mortalidad, la enfermedad implica un importante obstáculo para la actividad pecuaria, tanto por las pérdidas que ocasiona en la producción de carne o leche como por las graves dificultades que trae aparejadas en la comercialización internacional de carnes y subproductos de origen animal. Se estima que mientras la Argentina formaba parte del circuito aftoso, dejó de ganar cerca de 1000 millones de dólares anuales, producto de la diferencia en el precio existente entre los circuitos aftoso y no aftoso, además de tener que hacer frente a la importante caída en el volumen de las exportaciones. Nuestro país no reportó oficialmente brotes de la enfermedad desde abril de 1994, y fue declarado libre de aftosa con vacunación en mayo de 1997 por la Organización Internacional de Epizootias (OIE). Aunque la vacunación cesó definitivamente en abril de 1999, los posibles beneficios deben ser contrastados con algunos riesgos potenciales. A principios de 1999 se detectaron brotes de fiebre aftosa en el estado brasileño de Mato Grosso do Sul, luego de una ausencia de cuatro años. A pesar del *status* del Paraguay de país libre, el brote fue inicialmente atribuido a ganado infectado presente la frontera entre el Paraguay y Brasil.

En el año 1998 hubo 370 casos sospechados de FA en nuestro país; sin embargo, luego de analizados, todos ellos resultaron ser negativos. Previo a la decisión de detener la vacunación antiaftosa en abril de 1999, el Servicio Nacional de Sanidad Animal (SENASA) evaluó 58.000 animales, incluyendo animales salvajes, determinándose que todos ellos fueron negativos. Este hecho podría sugerir que no existe más virus circulante en el país. Sin embargo, existen antecedentes en Europa sobre el riesgo de reaparición de la enfermedad, ya sea por la existencia de virus en reservorios naturales como por reintroducción desde países en los que la enfermedad es endémica. Dicho riesgo es mayor si la enfermedad está presente en países fronterizos.

2. El virus de la fiebre aftosa

El virus de la fiebre aftosa constituye el género aftovirus dentro de la familia *Picornaviridae*. Su genoma está constituido por una única molécula de ARN de cadena simple y polaridad positiva, de un tamaño aproximado a 8450 nucleótidos (Carroll *et al.*, 1984).

La partícula infectiva tiene un diámetro de aproximadamente 25 nm (Vasquez *et al.*, 1979), con una cápside proteica de simetría icosaédrica 5:3:2. La cápside está compuesta por sesenta copias de cada una de sus cuatro proteínas estructurales, denominadas VP1 a VP4, de pesos moleculares de alrededor de 23,2, 24,6 y 24,2 kDa para VP1, VP2 y VP3 respectivamente y de 9 kDa para VP4 (Boothroyd *et al.*, 1989). Esta última está miristilada y se localiza internamente (Boothroyd *et al.*, 1982; Chow *et al.*, 1987). Cada cara del icosaedro está formado por cinco trímeros de VP1, VP2 y VP3, que agrupados forman un pentámero con coeficiente de sedimentación 12 S. A su vez, cada cara externa de la partícula viral está formada por doce pentámeros (Vasquez *et al.*, 1972; Talbot *et al.*, 1973). En la partícula viral se encuentran, además, 1 a 2 copias de VP0 (precursor de las proteínas estructurales VP2 y VP4, Forss *et al.*, 1984) y la replicasa 3D (Newman *et al.*, 1994).

Las proteínas VP1, VP2 y VP3 adoptan una configuración espacial similar (Acharya *et al.*, 1989). Cada cadena polipeptídica se pliega sobre sí misma para dar origen a una estructura conocida como barril β , que consiste de ocho cadenas con estructura secundaria de lámina β ubicadas unas sobre otras y conectadas entre sí por bucles o *loops* expuestos al medio externo (House *et al.*, 1989). Las cadenas β forman las paredes del barril y se denominan con letras (A, B, C, etc.), mientras que los *loops* se denominan según las letras de las cadenas β que conectan (Figura 1).

El virión intacto tiene un coeficiente de sedimentación de 146 S que es fácilmente dissociable por tratamiento a pH < 7 en subunidades virales 12 S (Rueckert, 1985) que corresponden a pentámeros de VP1, VP2 y VP3, y un precipitado insoluble que contiene a VP4 (Burroughs *et al.*, 1971).

Luego de infecciones virales es posible obtener también otra clase de partículas, con un coeficiente de sedimentación de 75 S. Estas partículas representan

cápsides vacías, y son un producto naturalmente defectivo que contiene moléculas de VP1, VP2 y el precursor VP0, pero no contienen ARN.

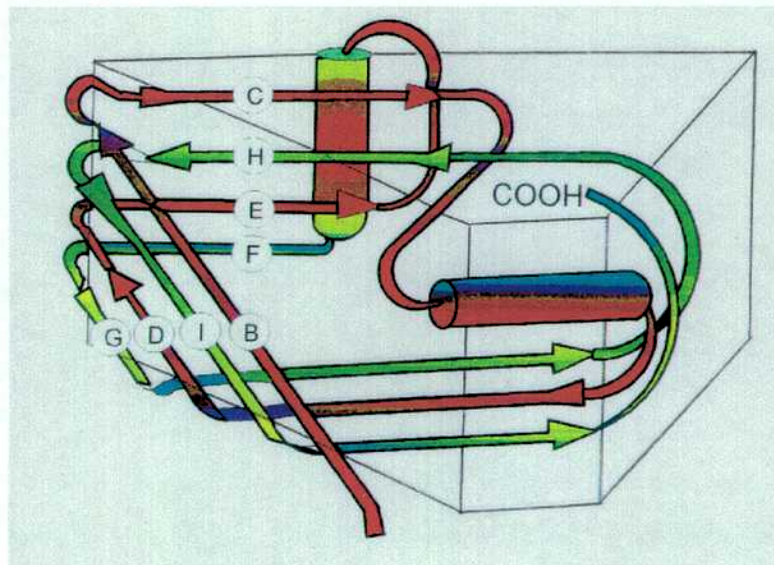


Figura 1. Representación esquemática del motivo de barril β que adoptan las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 del VFA. Las hojas plegadas β están representadas por flechas y se identifican por letras (B a I). Las estructuras de hélice α están representadas por cilindros (Hogle *et al.*, 1985).

El ARN viral posee un solo marco de lectura abierto que codifica para una única poliproteína que es capaz de sufrir un autoprocésamiento para dar lugar a los diferentes polipéptidos virales (Figura 2). En su extremo 5' se encuentra unida covalentemente una proteína viral de bajo peso molecular denominada VPg (Lee *et al.*, 1977; Golini *et al.*, 1978). En el extremo 3' existe un tramo de poliadenina (poli A) codificado por el virus y constituido por unos 40 a 100 nucleótidos (Chartejee *et al.*, 1976; Porter *et al.*, 1978). Entre la proteína VPg y el comienzo de la región codificante existe un tramo de policitidina (poli C) de 100 a 200 nucleótidos.

Río abajo de esta región de poli C se encuentra una zona con varios codones AUG no traducidos. Es en esta región donde se encuentra el sitio de unión a ribosomas (IRES), que comprende unas 435 bases y una extensa estructura secundaria (Belsham & Brangwyn, 1990; Kuhn *et al.*, 1990). El inicio de la traducción en este virus es un proceso "cap independiente", en el que la subunidad ribosomal se une directamente a este sitio de entrada interna de ribosomas o IRES.

El genoma se divide en cuatro regiones codificantes denominadas L, P1, P2 y P3. La traducción del mensajero viral comienza alternativamente en dos codones de iniciación separados entre sí por 84 nucleótidos, dando lugar a dos proteínas

líderes distintas: Lab, de peso molecular 23.000 y Lb, de peso molecular 16.000, dependiendo del AUG de iniciación (Belsham, 1992).

La proteína L tiene actividad proteolítica y se cliva a sí misma en el extremo amino terminal del precursor de las proteínas de la cápside.

Hacia el extremo 3' se halla la región P1 que codifica para las cuatro proteínas estructurales VP4, VP2, VP3 y VP1, que constituyen la cápside viral. Las regiones P2 y P3 codifican para las proteínas no estructurales del virus y están involucradas en la replicación.

El polipéptido 2A está formado por 16 aminoácidos y tiene actividad proteolítica.

Las funciones de las proteínas codificadas por las regiones 2B y 2C localizadas dentro del polipéptido P2 no han sido aún dilucidadas. Existen evidencias que indican que 2C y el precursor 2BC forman parte del complejo de replicación. La proteína 2C estaría involucrada en la síntesis de ARN viral y su función sería semejante a la de una helicasa (Porter, 1993).

A partir del precursor 3AB se origina la proteína VPg, constituida por 22 aminoácidos y que se une covalentemente por medio del aminoácido tirosina al extremo 5' de la cadena completa de ARN y a las cadenas nacientes.

La proteína 3A contiene un dominio altamente hidrofóbico que constituiría una región involucrada con el anclaje a membrana.

La proteína 2C y el precursor 3AB se hallan fuertemente asociados; por lo tanto, se postula que 2C se une también a membranas vía 3AB. Este complejo anclaría el ARN viral con el fin de proveer la organización espacial correcta y necesaria para su replicación (Porter, 1993).

La región 3C codifica para una proteasa cuya función es fundamental, pues es la enzima responsable de la mayoría de los clivajes relacionados con la maduración de la poliproteína precursora (Porter, 1993).

La región 3D codifica para la replicasa viral, que es una ARN polimerasa ARN dependiente. Se la denomina también antígeno VIAA (antígeno asociado a la infección viral) (Cowan & Graves, 1966).

El ciclo infectivo del VFA es un proceso rápido, cuya duración varía entre las 5 y 10 h, dependiendo de la cepa viral, célula hospedadora y factores del medio tales como pH, multiplicidad de infección y factores nutricionales de las células (Baltimore *et al.*, 1966).

La infección en cultivos celulares comienza con la adsorción del virus a la membrana plasmática de la célula hospedadora. Es un proceso reversible y su etapa inicial está gobernada por fuerzas electrostáticas, resultando necesaria la presencia de cationes bivalentes como Ca^{2+} y Mg^{2+} .

La proteína viral involucrada en la unión al receptor celular es VP1. Para la adsorción del virus a células resulta esencial la secuencia RGD del *loop* G-H de dicha proteína, aunque también puede realizarse por formación de complejos antígeno-anticuerpo utilizando los receptores Fc presentes en las células a infectar (Mason *et al.*, 1994).

El mecanismo propuesto para la entrada del genoma viral es la endocitosis mediada por el receptor. Se demostró que el pH ácido de los endosomas proporciona el medio adecuado para la ruptura del virus en subunidades 12S, dejando el ARN disponible para la replicación (Carrillo *et al.*, 1984).

La replicación del genoma se produce en el citoplasma por medio de la ARN polimerasa viral (3D) que sintetiza cadenas complementarias de polaridad negativa, las que constituyen el templado de las cadenas de polaridad positiva (Sangar, 1979). Durante el proceso de replicación se forma un intermediario de ARN doble cadena asociado al retículo endoplásmico liso.

Después de la infección de las células por el VFA, se inhiben la síntesis de ARN y proteínas celulares (Lucas-Lenard, 1979). El producto primario de la traducción es una poliproteína que corresponde a la totalidad de la región codificante. Este precursor no se detecta pues se cliva durante su traducción, originando las 4 proteínas precursoras P0-P3. Las mismas, a través de clivajes secundarios mediados por proteasas virales, generan las proteínas estructurales y no estructurales que se hallan en células infectadas.

El último evento en el procesamiento es el clivaje del precursor VP0 que genera VP2 y VP4. Este proceso ocurre en los picornavirus después del ensamblado de la cápside y está asociado con la encapsidación del ARN viral y con la adquisición de infectividad del provirión. Además, el clivaje de VP0 resulta en un reordenamiento estructural dentro de la cápside que incrementa en alto grado su estabilidad (Harris *et al.*, 1990).

El ciclo se completa con la lisis de la célula hospedadora que libera el virus al medio externo.

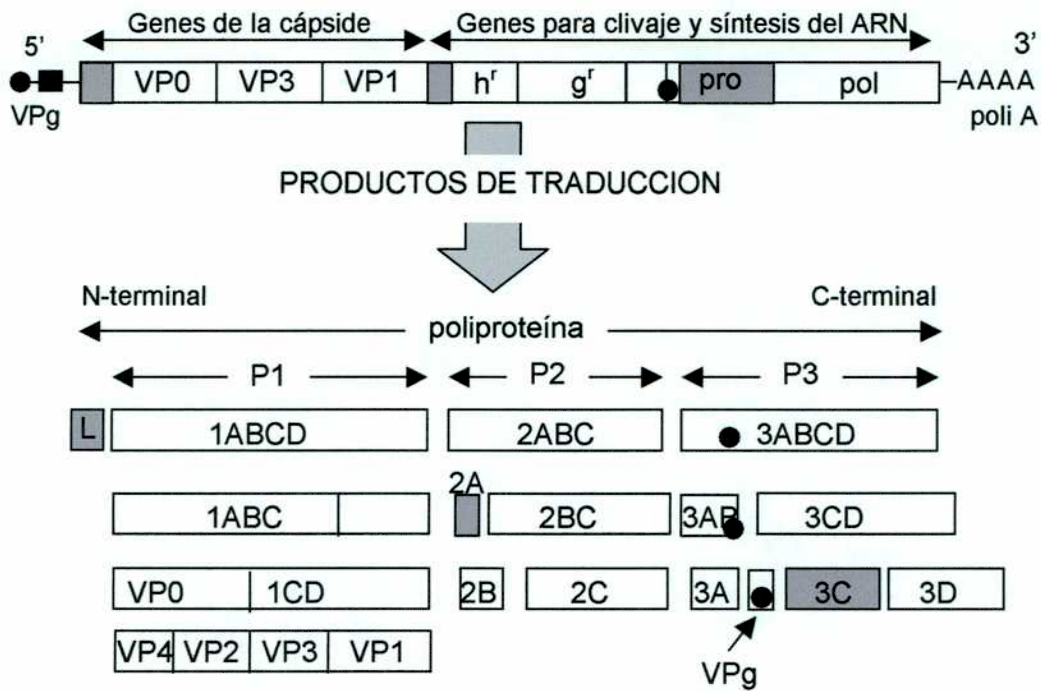


Figura 2. Organización y expresión del genoma del VFA. El rectángulo negro sobre la región 5' no traducida indica la presencia de un trecho de poli C. La síntesis de la proteína ocurre desde la izquierda (región N terminal) a la derecha (región C terminal). Las funciones de crecimiento, esto es, las proteínas necesarias para la síntesis de ARN y las proteasas requeridas para el clivaje de la poliproteína están codificadas río abajo de la región de las proteínas de cápside. *g^r* representa el marcador de resistencia a guanidina, un locus genético que afecta la acción de una droga implicada aparentemente en el bloqueo del inicio de la síntesis de ARN. El gen 2B, *h^r*, lleva un determinante de rango de hospedador involucrado en la síntesis de ARN. El clivaje de la poliproteína es llevado a cabo por la acción de tres proteasas: 2A, L y 3C. El clivaje de maduración (VP0 → VP2 + VP4) ocurre sólo después que el ARN ha sido empaquetado en la cubierta proteica y es llevado a cabo por la proteasa 2A. El extremo amino de P1 y de 1A está bloqueado por un grupo miristilo.

3. Características antigénicas del VFA

El primer análisis de la antigenicidad del VFA mostró que cuando se vacunaban o infectaban animales experimentales con VFA, sus sueros reconocían mediante anticuerpos dos componentes diferentes en las preparaciones de VFA purificado: viriones 146 S y subunidades 12 S. Algunos epitopes son compartidos por ambas clases de partículas, ya que la actividad anti-146 S de un suero se ve disminuida cuando éste es previamente adsorbido con partículas 12 S (Cowan, 1968).

La idea original de que sólo la partícula 146 S induce la producción de anticuerpos neutralizantes (Brown *et al.*, 1963) fue revisada cuando se demostró que tanto cerdos como bovinos vacunados con partículas 12 S emulsificadas en adyuvante oleoso resistían a la infección con virus homólogo (Morgan *et al.*, 1980).

De todas las proteínas estructurales, la única capaz de inducir anticuerpos neutralizantes cuando se inocula aisladamente es VP1 (Laporte *et al.*, 1973). Con posterioridad se demostró que péptidos sintéticos correspondientes a las regiones 140-160 y 200-213 de VP1 eran capaces de inducir títulos altos de anticuerpos neutralizantes (Pfaff *et al.*, 1988; Bittle *et al.*, 1982). La región comprendida entre los aminoácidos 140 y 160 de VP1 es una región hipervariable y se considera como el sitio antigénico principal del VFA en los serotipos A, O y C (revisión en Domingo *et al.*, 1990). Esta región interviene en la estructura tanto de epitopes continuos como discontinuos y es protuberante en el virión, como se comprobó al estudiar la estructura tridimensional del virus a partir de datos cristalográficos (Acharya *et al.*, 1990). Esta región contiene además la secuencia aminoacídica RGD, posiblemente implicada en la unión al receptor celular (Fox *et al.*, 1989).

La obtención de anticuerpos monoclonales permitió determinar los epitopes críticos para la neutralización de este virus en ratones (Stave *et al.*, 1986; Mateu *et al.*, 1987; Saiz *et al.*, 1989), así como su localización en la estructura primaria de las proteínas estructurales, ya sea mediante la secuenciación directa del ARN de variantes virales capaces de escapar a la neutralización por anticuerpos monoclonales (Barnett *et al.*, 1989; Baxt *et al.*, 1989; Kitson *et al.*, 1990; Saiz *et al.*, 1991) como determinando su reactividad frente a péptidos sintéticos (Mateu *et al.*, 1990). De este modo se ha establecido la presencia en la superficie del virión de dos o tres sitios adicionales a la región 140-160 antigénica e inmunogénicamente relevantes, dependiendo del serotipo, así como la incidencia de la variabilidad antigénica de los distintos epitopes (revisión en Domingo *et al.*, 1990).

Una de estas secuencias adicionales se localiza en el extremo carboxilo terminal de la proteína VP1, comprendiendo los aminoácidos 200 a 213, constituyendo el sitio antigénico continuo C.

Además de estos sitios continuos, se describió para el serotipo mediante secuenciación de mutantes resistentes a la neutralización C un sitio antigénico discontinuo, el sitio antigénico D, que incluye el *loop* B-C de la proteína VP2 (residuos 70 a 80) y el knob B-B de la proteína VP3 (residuos 58 a 61), además de parte de la región carboxilo terminal de VP1 (alrededor del aminoácido de la posición 193). Este sitio antigénico contiene epitopes relacionados también con la neutralización viral (Lea *et al.* 1994).

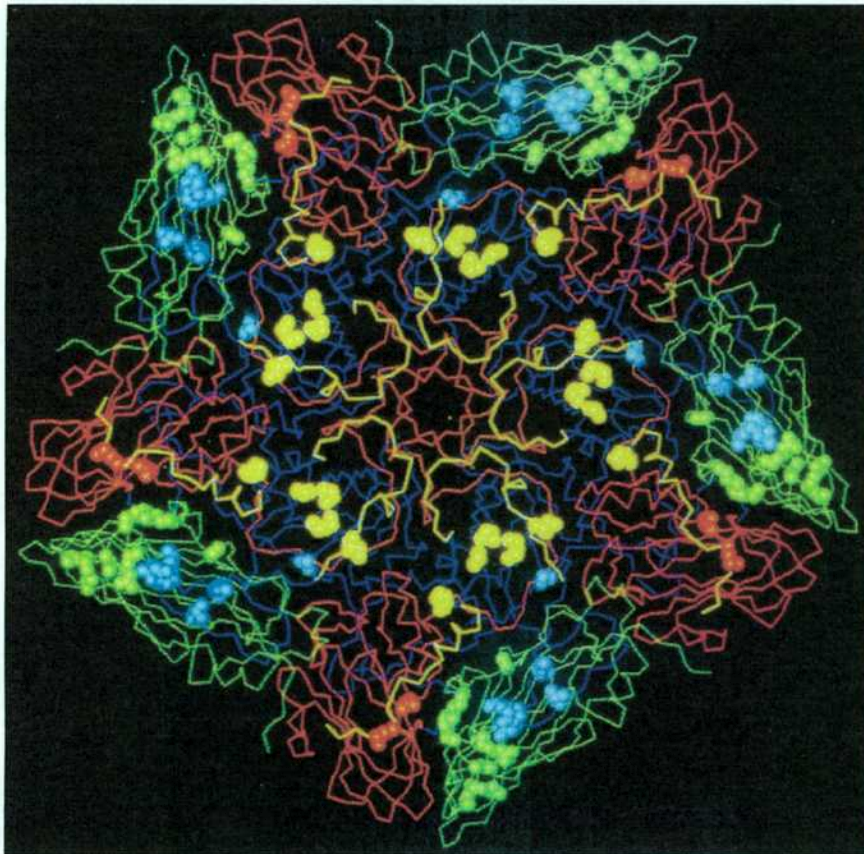


Figura 3. Estructura tridimensional del virión del VFA. En color azul se representa la proteína VP1, en color verde se representa la proteína VP2, en color rojo se representa la proteína VP3 y en amarillo, la proteína VP4. La secuencia comprendida entre los aminoácidos 133 y 158 de VP1 se representa en celeste.

4. La respuesta inmune contra el VFA

Cualquier respuesta inmune producida en un organismo frente a un agente infeccioso combina distintos mecanismos dirigidos a la eliminación del patógeno. Los resultados obtenidos para diversas especies susceptibles al VFA indican que los anticuerpos circulantes juegan un papel muy importante en la protección *in vivo* frente a la infección, existiendo en general una buena correlación entre niveles altos de anticuerpos neutralizantes determinados en ensayos *in vitro* y protección frente a la infección natural con el VFA (Van Bekkum, 1959). No obstante, la existencia de altos niveles de anticuerpos no garantiza dicha protección, ya que cuando se inoculan péptidos sintéticos que imitan un epítipo localizado en el extremo carboxi terminal de VP1 se producen altos niveles de anticuerpos neutralizantes pero escasa protección (Meloan & Barteling, 1986). El método de

seroneutralización *in vitro* empleado habitualmente sólo permite determinar la capacidad de los anticuerpos de neutralizar partículas virales, desconociéndose el papel de los restantes mecanismos dependientes de anticuerpos (opsonización, complemento y citólisis mediada por anticuerpos) en la protección *in vivo* frente al VFA. Se sugirió que la opsonización de las partículas virales puede tener importancia en la eliminación de virus de ratones inmunizados pasivamente con anticuerpos monoclonales neutralizantes (McCullough *et al.*, 1986).

Se demostró en ratones y bovinos que la respuesta inmune frente al VFA es T dependiente (Collen *et al.*, 1989; Collen & Doel, 1990). En particular, estas células juegan un importante papel en el establecimiento de memoria inmunológica. Sin embargo, se demostró mediante experimentos con ratones singéneos previamente irradiados e infectados que los linfocitos T no son necesarios para la eliminación de virus, ya que células B purificadas de ratones infectados son capaces de abortar una infección viral en ratones receptores (Borca *et al.*, 1986).

Debido al exhaustivo conocimiento de sus subpoblaciones celulares y a la sencillez de su manipulación, el ratón ha sido largamente utilizado como modelo experimental para el estudio de la respuesta inmune hacia numerosas enfermedades infecciosas. Aunque los ratones adultos no son susceptibles a la infección natural con VFA, pueden ser experimentalmente infectados (Cunha & Eichorn, 1954; Subak-Sharpe, 1961; Subak-Sharpe *et al.*, 1962). Luego de ser inoculados intraperitonealmente con altas dosis virales, los ratones manifiestan una infección subclínica, con replicación viral principalmente en células del páncreas acompañada de viremia 72 h post infección (Fernández *et al.*, 1986). A partir del momento en que se detectan títulos significativos de anticuerpos neutralizantes, se observa una rápida disminución en la viremia, hasta su eliminación total. Esta correlación entre altos títulos de anticuerpos neutralizantes y eliminación de la viremia se ve confirmada por el hecho de que existe un retraso en la aparición de anticuerpos neutralizantes en animales irradiados e infectados y posteriormente reconstituidos con células inmunocompetentes de ratones inmunizados con virus activo (Borca *et al.*, 1984).

En ratones y en bovinos, la infección con VFA induce inmunidad de por vida, mientras que la vacunación con VFA inactivado administrado en dosis bajas (0,1 µg) induce inmunidad por breves períodos. El resultado de la fuerte inmunidad inducida por infecciones virales no parece deberse a la persistencia viral (López *et*

al., 1990). También se demostró que la respuesta inmune inducida por infecciones experimentales o por vacunación con altas dosis de virus inactivado (10 µg) es semejante. Linfocitos B provenientes de ratones vacunados con altas dosis de virus inactivado pueden eliminar la infección de receptores inmunodeprimidos sin intervención de linfocitos T, mientras que linfocitos B sensibilizados con bajas dosis sólo son eficientes cuando hay cooperación con células T específicamente sensibilizadas (Piatti *et al.*, 1991).

5. La vacunación como herramienta de prevención

La prevención de enfermedades implica el establecimiento de los mecanismos de defensa del organismo y su activación previamente a la interacción con el patógeno específico, de manera que el hospedador inicie una rápida respuesta a la infección. En mamíferos, la vacunación es el método preventivo más económico y efectivo. Se han desarrollado y utilizado diferentes tipos de vacunas desde que Jenner, casi doscientos años atrás, utilizó una vacuna atenuada contra la viruela.

El concepto básico para el diseño de una vacuna es simular en el hospedador la infección con el patógeno o, al menos, aquellos aspectos de la infección natural importantes para montar los mecanismos destinados a su eliminación, activándose entonces simplemente su memoria inmunológica.

No existe una única clase de vacunas aplicable a los diferentes tipos de patógenos animales y es de vital importancia conocer los mecanismos precisos de interacción, así como los aspectos relevantes de la respuesta inmune involucrados en la eliminación de la infección.

En los últimos treinta años, con el advenimiento de la biología molecular, la ingeniería genética y la inmunología, pudieron desarrollarse nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas. En particular, el clonado y expresión de genes, la caracterización estructural de patógenos y la identificación de los epitopes inmunodominantes involucrados en la respuesta inmune humoral y celular hicieron posibles la transferencia de información genética de un organismo a otro no relacionado y el diseño de nuevas estrategias de vacunación que permitieron salvar algunas de las dificultades relacionadas con las vacunas clásicas.

Cada clase de vacunas tiene ventajas y desventajas particulares. Así, las **vacunas inactivadas** son inocuas, confieren buenos niveles de protección, principalmente

en revacunaciones, y existe una probada experiencia en su producción y en sus efectos. Sin embargo, tienen altos costos de producción, son inestables, la duración de la inmunidad es corta, despiertan una respuesta inmune principalmente humoral, necesitan del uso de adyuvantes, y se asocian a riesgos de bioseguridad por manipulación del patógeno en las plantas de producción, de escapes desde los laboratorios y de inadecuada inactivación.

Las **vacunas atenuadas** son de bajo costo y de formulación sencilla (no requieren de adyuvantes), confieren inmunidad de larga duración y pueden despertar tanto una respuesta inmune celular como humoral. Como desventajas, existe la posibilidad de reversión de cepas atenuadas a virulentas, son inestables a la temperatura, pueden ser patógenas para animales inmunocomprometidos, presentan riesgos de bioseguridad en las plantas productoras y dificultan la diferenciación entre animales vacunados e infectados.

Las **vacunas a subunidades** tienen una composición definida, son altamente seguras al no involucrar agente patógenos y no necesitan condiciones de bioseguridad elevadas para su producción. Tienen, sin embargo, las desventajas de conferir en general bajos niveles de protección, respuestas muy específicas, inmunidad de corta duración, pueden producir selección de variantes, despiertan principalmente respuestas humorales y necesitan de adyuvantes y de repetidas revacunaciones.

Finalmente, las **vacunas quiméricas** son fáciles de producir, pueden despertar respuestas celulares y humorales y permiten diferenciar animales vacunados e infectados. Tienen las desventajas de ser sensibles a la temperatura, brindan respuestas específicas y pueden seleccionar variantes.

En el caso particular de la fiebre aftosa, el control de la enfermedad se efectúa mediante la utilización de vacunas a virus inactivado por agentes químicos.

La primera fuente de antígeno viral utilizada fue el epitelio lingual de bovinos infectados. El virus se adsorbía a un gel de hidróxido de aluminio y luego se inactivaba con formaldehído. Este método fue reemplazado por el desarrollado por Frenkel, basado en la producción a gran escala del VFA *in vitro* utilizando cultivos de epitelio lingual bovino (Frenkel, S.H., 1951). Las partículas virales, luego de ser cosechadas, clarificadas y filtradas, se adsorbían a un gel de hidróxido de aluminio y luego se inactivaban con formaldehído. El sistema presentaba ventajas importantes como la simpleza de su ejecución, los altos y constantes niveles de

producción viral y no requerían de adaptación del virus al cultivo. Las vacunas elaboradas por este método fueron aplicadas con éxito en diferentes países.

En la década del '60 comenzó a producirse el virus en cultivos de células crecidas en monocapas. En principio se utilizaron cultivos primarios de riñón bovino y más tarde se reemplazaron por cultivos de células BHK21 (Mowat *et al.*, 1962), siendo éstos los más utilizados en la actualidad.

Para la producción a escala industrial de virus se infectan células BHK crecidas en suspensión (Radlet *et al.*, 1985) en tanques fermentadores de hasta 5000 litros. Las suspensiones virales obtenidas en los fermentadores son concentradas por ultrafiltración (Strohmaier, L., 1967) o por precipitación con polietilenglicol y óxido de polietileno (Wagner *et al.*, 1970). Dado que la inactivación mediada por formaldehído presenta algún riesgo de permanencia de infección residual y de pérdida de inmunogenicidad de las partículas virales, el procedimiento más usado actualmente para la inactivación de las partículas virales es el agregado de la etilenimina primaria BEI (Bahnemann, 1975).

Dado que el virus inactivado presenta baja inmunogenicidad, es necesario el agregado de sustancias adyuvantes que actúan como vehículos y como inmunoestimulantes.

Las primeras vacunas contra la FA basadas en virus inactivado que se desarrollaron fueron las acuosas, que utilizaban hidróxido de aluminio o saponina como adyuvantes. Los animales vacunados con las vacunas acuosas que contienen saponinas se protegen por un período de 4 meses.

La introducción de adyuvantes oleosos, como el adyuvante incompleto de Freund, significó un gran avance en el logro de estados de protección más duraderos. La formulación de las vacunas oleosas fue perfeccionada en nuestro país con nuevas mezclas de aceites minerales (Rivenson *et al.*, 1982). Estas formulaciones permitieron que la frecuencia de vacunación se redujera de tres a dos veces por año en los animales de hasta dos años de edad y a una vez por año en animales mayores de 5 años.

El nivel y duración de la inmunidad depende de la calidad de la vacuna, del número de vacunaciones recibidas (dado que una revacunación induce una respuesta inmune secundaria) y de la edad y patrimonio genético de los animales.

A pesar de que este tipo de vacunas permitió la erradicación de la enfermedad en muchas partes del mundo, incluyendo la Argentina, su empleo presenta varias

desventajas: la manipulación de grandes cantidades de virus y la probabilidad cierta de una incorrecta inactivación del virus, que tuvieron relación directa con la aparición de brotes en Europa durante la última década (Beck & Strohmaier, 1987), la necesidad de mantener una cadena de frío, la indefinida composición química del contenido de antígeno viral y la presencia de contaminantes celulares, hecho relacionado con la generación de *shocks* anafilácticos (Barteling & Vreeswijk, 1991) y la dificultad en la diferenciación entre animales vacunados e infectados ocasionada por la presencia de proteínas no estructurales en las preparaciones vacunales (Pinto & Garland, 1979, Silberstein *et al.*, 1997).

El advenimiento de las tecnologías del ADN recombinante y la ingeniería genética, junto con la determinación de la estructura tridimensional del virión mediante cristalografía y la producción de anticuerpos monoclonales, permitieron el reconocimiento de las regiones virales involucradas en la respuesta inmune y el diseño de nuevas estrategias para el desarrollo de vacunas sintéticas alternativas. Una de ellas fue el desarrollo de virus atenuados obtenidos por sucesivos pasajes en cultivos celulares y clonado viral (Mowat 1961, Mowat 1964). Estas cepas adaptadas a ratón mostraron buenos resultados en animales de laboratorio, pero estos virus atenuados revirtieron a virulentos en bovinos vacunados a campo, por lo que los países europeos libres de la enfermedad restringieron la importación de carnes provenientes de países que implementaban este tipo de vacunación. Otra estrategia aplicada para el desarrollo de nuevas vacunas fue la expresión de los epitopes principales de VP1 de serotipo O1 formando parte de un vector vivo constituido por una cepa atenuada del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina (Kit *et al.*, 1991). Con este virus quimérico fue posible inducir una respuesta inmune humoral contra el VFA.

También se desarrollaron virus vaccinia recombinantes expresando la poliproteína precursora P1 o la proteína estructural VP1, con los que se obtuvo una respuesta inmune específica contra el VFA, aunque con un componente más celular que humoral (Sanz-Parra *et al.*, 1998).

Con la obtención de copias de ADN infectivas del VFA (Zibert *et al.*, 1990, Rieder *et al.*, 1993) pudieron desarrollarse, mediante manipulación de secuencias, virus atenuados de serotipo A12. Así, experimentos de vacunación con las variantes virales con deleciones en el sitio de entrada a la células blanco protegieron bovinos contra el desafío con virus homólogo (Mc Kenna *et al.*, 1995). También se

desarrollaron virus con deleciones en la proteasa líder con replicación atenuada en bovinos (Piccone *et al.*, 1998) y confirieron protección parcial a animales vacunados (Mason *et al.*, 1997, Chinsangram *et al.*, 1998).

Por otro lado, una vez establecida la importancia antigénica de la proteína VP1 y de sitios antigénicos dentro de esta proteína, se desarrollaron una serie de vacunas a subunidades mediante técnicas de ingeniería genética involucrando la expresión de VP1 y de los epitopes relevantes de la misma en diferentes sistemas heterólogos. Por ejemplo, la proteína VP1 fue expresada en *E. coli* (Küpfer *et al.*, 1981, Kleid *et al.*, 1981) y al ser inoculada en cerdos y bovinos indujo altos niveles de anticuerpos neutralizantes y protección frente al desafío con VFA (Kleid *et al.*, 1981). Sin embargo, esta proteína resultó mucho menos inmunogénica que el virus entero inactivado, cuando se compararon cantidades equivalentes de VP1 en ambas clases de vacunas.

Asimismo, los sitios antigénicos inminodominantes de VP1 (comprendidos aproximadamente entre los aminoácidos 140-160 y 200-213) se fusionaron a diferentes proteínas transportadoras, como β galactosidasa de *E. coli*, TrpE de *E. coli* y la proteína core del virus de la hepatitis B (VHB). Aunque una copia simple del sitio antigénico A fusionado a β galactosidasa no despertó una respuesta inmune adecuada, construcciones que contenían 2 a 4 copias en tándem de este sitio antigénico indujeron una respuesta inmune protectora en cobayos (Broekhuijsen *et al.*, 1987). También se obtuvieron buenos niveles de protección vacunando cobayos con una proteína de fusión entre dos sitios antigénicos de VP1 del VFA serotipo C (141-158 y 200-213) y la proteína TrpE (Giavedoni *et al.*, 1991) o entre el sitio A del serotipo A unido a la misma proteína (Morgan & Moore, 1990). Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron usando fusiones del sitio antigénico A con la proteína core del virus de la hepatitis B. Cuando se expresaron tales construcciones en células de mamífero mediante un virus vaccinia recombinante, la proteína quimérica se ensambló en partículas de unos 27 nm, del mismo modo en que se ensambla la proteína core en infecciones naturales con VHB (Clarke *et al.*, 1987). La naturaleza particulada, junto a la presencia de fuertes epitopes para linfocitos T colaboradores presentes en la proteína core, fueron responsables de la alta inmunogenicidad de tales quimeras (comparable a la de la partícula viral entera), con las que se logró proteger cobayos frente al desafío. Debido a los bajos rendimientos obtenidos en este sistema, fusiones semejantes se

expresó con éxito empleando bacterias (Francis y Clarke, 1989) y levaduras (Beasley *et al.*, 1990).

También la poliproteína P1 fue empleada como vacuna a subunidad por diferentes investigadores. El polipéptido no procesado P1-2A expresado en el sistema "baculovirus-células de insecto" y usado como vacuna oleosa despertó una escasa respuesta humoral y protegió parcialmente cerdos contra el desafío viral (Grubman *et al.*, 1993). Saiz y colaboradores mostraron que el precursor P1-2A de serotipo C expresado en el sistema "baculovirus células de insecto" adquiere un plegamiento espacial que le permite adquirir epitopes discontinuos como los presentes en la partícula viral natural involucrados en la neutralización (Saiz *et al.*, 1994).

Con el objeto de desarrollar vacunas que reprodujeran la estructura tridimensional de todos los sitios antigénicos del VFA, se realizaron experimentos con cápsides virales vacías para diferentes serotipos utilizando como sistemas de expresión bacterias o células de insecto. Las cápsides vacías se obtienen naturalmente a partir de células infectadas con VFA. Tienen un coeficiente de sedimentación de 75 S y son morfológica y antigénicamente semejantes a los viriones enteros, aunque menos estables. Estas partículas vacías son capaces de inducir niveles de anticuerpos neutralizantes semejantes a los producidos por los viriones enteros (Rowlands *et al.*, 1975, Rweyemamu *et al.*, 1979). En *E. coli*, la expresión del precursor P1 y de la proteasa 3C produjo todos los productos del procesamiento de P1 y su ensamblaje en partículas vacías, las que despertaron una respuesta inmune en cobayos (Lewis *et al.*, 1991) y cerdos (Grubman *et al.*, 1993). En el sistema "baculovirus-células de insecto", la coexpresión de P1-2A y las proteasas L y 3C también condujo a la formación de cápsides vacías, aunque con una baja eficiencia (Roosien *et al.*, 1990). También se obtuvieron partículas vacías con baja eficiencia utilizando virus vaccinia y células de mamífero (Abrams *et al.*, 1995).

Sin embargo, y a pesar de todas estas numerosas investigaciones en el campo de la biotecnología tendientes a obtener vacunas efectivas, no se dispone en la actualidad de una vacuna contra el VFA para uso comercial.

6. Los Baculovirus como sistema de expresión

Los baculovirus (familia *Baculoviridae*) pertenecen a un grupo diverso de virus de ADN de doble cadena que infectan muchas especies de insectos como sus hospedadores naturales. Sus cepas son altamente especie específicas y no se propagan en ningún hospedador no invertebrado. El genoma de los baculovirus se replica y transcribe en el núcleo de las células infectadas, donde su gran genoma (de entre 80 y 200 kilobases) se empaqueta en nucleocápsides con forma de barra. Debido a que el tamaño de estas nucleocápsides es flexible, su genoma puede acomodar grandes cantidades de ADN foráneo.

El virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV) es el baculovirus más estudiado de la familia; su genoma ha sido mapeado y totalmente secuenciado. El virus entra a las células susceptibles mediante endocitosis facilitada o fusión, y el ADN viral se desnuda en el núcleo. Tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, su ciclo de vida puede dividirse en dos fases, una temprana y otra tardía. Durante la fase temprana, las células infectadas liberan partículas virales extracelulares por brotado desde la membrana celular. Durante la fase tardía del ciclo de infección, dentro del núcleo celular se ensamblan las partículas virales ocluidas. Estas partículas están embebidas en una matriz proteica homogénea formada principalmente por una única proteína, la proteína poliedrina. Durante esta fase tardía de infección, estas partículas virales ocluidas son liberadas cuando las células infectadas se lisan. Mientras que las partículas virales extracelulares se detectan 10 horas post infección, los primeros cuerpos de oclusión en infecciones con baculovirus salvajes se detectan 3 días post infección pero siguen acumulándose hasta alcanzar un máximo entre los 5 y 6 días post infección. Estos cuerpos de oclusión son visibles bajo microscopio óptico donde se observan como cuerpos poligonales muy refringentes llenando el núcleo de las células infectadas (Figura 5).



Figura 5. Célula Sf9 infectada con el baculovirus AcNPV. Los poliedros refringentes están constituidos mayoritariamente por la proteína poliedrina y embeben los viriones. Fotografía obtenida en el Instituto de Biotecnología del CICVyA-INTA Castelar.

La proteína poliedrina, componente mayoritario de los cuerpos de oclusión, tiene un peso molecular de 29 kDa (O'Reilly *et al.*, 1992). Durante la fase tardía de la infección, esta proteína se acumula a muy altos niveles, pudiendo alcanzar cantidades de hasta 1 mg cada $1-2 \times 10^6$ células, o un 30 al 50 % de las proteínas totales de un insecto infectado. A pesar de ser una de las proteínas más abundantes de las células de insecto infectadas, esta proteína no es esencial en el ciclo de vida de los baculovirus en cultivo de tejidos. La inactivación por delección o inserción del gen de poliedrina resulta en la producción de baculovirus con fenotipo "cuerpos de oclusión negativos".

Las estrategias clásicas de clonado de genes de interés en vectores de expresión adecuados involucran generalmente digestiones con enzimas de restricción que reconocen cortas secuencias palindrómicas de ADN, a menudo únicas en la secuencia del plásmido, y ubicadas río abajo de un promotor, de manera que éste regule la transcripción de ARNm codificada en la secuencia de interés clonada en dicho plásmido. Estas metodologías resultan muy complejas si el vector es un genoma viral, pues su gran tamaño lo vuelve extremadamente frágil a las manipulaciones, y en general no hay uno sino múltiples sitios de reconocimiento para enzimas de restricción.

Para la construcción de baculovirus recombinantes se han desarrollado vectores llamados de transferencia, de tamaños similares a los plásmidos bacterianos y que poseen un sitio múltiple de clonado (SMC) con sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción, posicionado río abajo de un promotor fuerte de un gen no esencial, un gen de resistencia a antibiótico como marcador de selección y un origen de replicación para su multiplicación en bacterias. Flanqueando al promotor y al SMC se encuentran secuencias homólogas a las del locus del gen no esencial, de manera de permitir la recombinación homóloga con el ADN de baculovirus y el reemplazo alélico del dicho gen por la secuencia codificante que se quiere expresar.

En este trabajo se empleó el vector de transferencia **pVL-1393**, que contiene el locus completo del gen codificante para la proteína poliedrina incluyendo secuencias flanqueantes del baculovirus AcNPV, clonados en el plásmido bacteriano pUC8, pero carece de parte de la región codificante para poliedrina. Además, posee un SMC 37 nucleótidos río abajo del codón de iniciación ATG de poliedrina, el que ha sido cambiado a ATT.

La obtención de baculovirus recombinantes se basa en la transfección simultánea de células de insecto con ADN de baculovirus y ADN del plásmido de transferencia llevando el gen de interés, la recombinación dentro de las células de insecto llevada a cabo por la maquinaria celular, y la selección de los baculovirus recombinantes.

La infección de baculovirus salvajes resulta en la producción de cuerpos de oclusión constituídos de poliedrina en las células de insectos susceptibles. Este fenómeno fue utilizado en el pasado para identificar baculovirus recombinantes con el gen de poliedrina reemplazado por el de interés : los virus recombinantes que expresan la proteína de interés en vez de poliedrina no producen cuerpos de oclusión y las placas de lisis producidas por éstos pueden ser fácilmente distinguibles de las producidas por virus salvajes. Sin embargo, ya que los baculovirus recombinantes derivan de eventos de recombinación homóloga entre el plásmido y el genoma viral, la gran mayoría de los virus producidos no son recombinantes, usualmente en una proporción de 1.000 :1. Además, debido a que las placas de lisis tempranas de virus salvajes muestran a menudo un fenotipo oclusión negativo, existe el riesgo de seleccionar recombinantes falsos positivos.

En los últimos años se han introducido numerosas mejoras a fin de aumentar la cantidad de eventos de recombinación, facilitar la selección de recombinantes y aumentar la proporción de estos últimos en relación a los virus salvajes. En principio, pudo producirse mediante técnicas de ingeniería genética una delección letal en el genoma viral, de manera que sólo aquellos genomas virales que recombinaran con el vector de transferencia que llevara la secuencia delecionada junto con el gen de interés pudieran replicar dentro de las células de insecto. Esto llevó a la obtención de poblaciones recombinantes homogéneas tras la cotransfección, además de aumentar el número de eventos de recombinación por el hecho de que el genoma viral estuviera en forma lineal, con las secuencias a recombinar en los extremos, en vez de estar en su conformación natural, superenrollada.

Varias características particulares del sistema de expresión "baculovirus-células de insecto" lo distinguen de los sistemas de expresión bacterianos. A menudo, las proteínas expresadas en sistemas bacterianos son insolubles, se agregan o se pliegan espacialmente de manera incorrecta. En contraste, las proteínas expresadas en este sistema son solubles y funcionalmente activas en la mayoría de los casos.

La siguiente tabla resume algunas de estas características:

Característica	Baculovirus	Bacterias
Simpleza	✓	✓
Tamaño de la proteína	ilimitado	< 100 kDa
Expresión múltiple	✓	
Clivaje de péptido señal	✓	
Splicing de intrones	✓	
Transporte nuclear	✓	
Proteína funcional	✓	a veces
Fosforilación	✓	a veces
Glicosilación	✓	
Acilación	✓	
Ministilación	✓	

Como se resume en la tabla anterior, este sistema de expresión es capaz de sintetizar proteínas recombinantes de tamaños casi ilimitados a muy altos niveles de expresión, con correctas modificaciones post traduccionales y correcta localización celular. Por otra parte, debido al hecho de que la proteína poliedrina se

sintetiza en una fase tardía de la infección viral, es posible expresar proteínas con altos niveles de toxicidad, difíciles de expresar en otros sistemas.

6. Las partículas quiméricas semejantes a virus

El nombre "quimera" se ha usado en biología molecular por muchos años para describir, por ejemplo, proteínas de fusión, pero en la actualidad comenzó a emplearse para partículas semejantes a virus (VLPs) que se ensamblan a partir de tales proteínas de fusión. Las secuencias foráneas pueden ser epitopes de otros virus, bacterias o parásitos, aunque también pueden ser motivos de unión a ácidos nucleicos u otros ligandos como, por ejemplo, moléculas receptoras particulares.

Su historia comenzó alrededor del año 1980, y tuvo como requisitos previos el desarrollo de sistemas de expresión en *E. coli* y levaduras, y el uso de estos sistemas para la expresión de cápsides virales y proteínas de envoltura, en particular, las derivadas del virus de la hepatitis B (VHB). La expresión del antígeno core del VHB en *E. coli* (Burrell *et al.*, 1979; Pasek *et al.*, 1979; Edman *et al.*, 1981; Stahl *et al.*, 1982) y de la proteína pequeña (S) del antígeno de superficie en levaduras (Valenzuela *et al.*, 1982; Harford *et al.*, 1982) resultó en el autoensamble de estas proteínas en partículas semejantes a virus, aún en la ausencia de cualquier otro componente viral. Estas partículas fueron morfológica e inmunogénicamente indistinguibles de los verdaderos productos de ensamble del VHB (Valenzuela *et al.*, 1982; Harford *et al.*, 1982; Cohen & Richmond, 1982; Milich *et al.*, 1988).

El desarrollo y uso de una vacuna recombinante contra la hepatitis B basada en partículas del antígeno S expresadas en levaduras sirvió como un fuerte estímulo para futuros intentos en desarrollos de este tipo. De esta manera, también se produjeron las proteínas mediana (M) y grande (L) del antígeno de superficie del VHB independientemente por dos laboratorios y posteriormente se desarrolló la coexpresión y coensamble de varias proteínas del VHB en una única partícula, también en levaduras (Jacobs *et al.*, 1989).

A las proteínas derivadas del VHB capaces de autoensamble se agregaron la proteína p1 expresada en levaduras y codificada por el retrotransposón de levaduras Ty (Adams *et al.*, 1994) y proteínas de cubierta de bacteriófagos a ARN expresadas y ensambladas en *E. coli* o levaduras, como las de los fagos MS2

(Mastico *et al.*, 1993) y del virus del mosaico de Johnsongrass (Jagadish *et al.*, 1991).

El desarrollo de otros sistemas de expresión, en particular el sistema "baculovirus-células de insecto" fue el acontecimiento que marcó un nuevo impulso al desarrollo de las partículas semejantes a virus. De esta manera, en la década de los '90 se crearon VLPs para una serie de virus mediante la utilización de este sistema, por ejemplo, de rotavirus (Redmond *et al.*, 1993; Crawford *et al.*, 1994; Zeng *et al.*, 1994), virus de la lengua azul o BTV (French & Roy, 1990; French *et al.*, 1990), virus de la hepatitis A (Rosen *et al.*, 1993), virus adeno-asociados (Ruffing *et al.*, 1992), papilomavirus humanos (Kirnbauer *et al.*, 1992; Rose *et al.*, 1994; Volpers *et al.*, 1994) parvovirus (Kajigaya *et al.*, 1991; Salimans *et al.*, 1992), virus del sarampión (Fooks *et al.*, 1993) y retrovirus, en particular, lentivirus (Delchambre *et al.*, 1989; Gheysen *et al.*, 1989; Luo *et al.*, 1990; Rasmussen *et al.*, 1990; Thomsen *et al.*, 1992). Además del sistema baculovirus, se emplearon células de mamífero para la síntesis de otras VLPs, como el antígeno de superficie (Michel *et al.*, 1993), la proteína gag (Spearman *et al.*, 1994) y las proteínas L1 y L2 del papilomavirus humano tipo 1 (Hagensee *et al.*, 1993).

La posibilidad de expresar varias proteínas al mismo tiempo en células de insecto, hecho desarrollado primero en el virus de bluetongue (Loudon & Roy, 1991), facilitó el estudio de los procesos de ensamble en sistemas heterólogos e hizo posible el coensamble de múltiples proteínas de cápside de otros virus, como rotavirus (Crawford *et al.*, 1994) y poliovirus (Bräutigam *et al.*, 1993).

Las VLPs tienen grandes ventajas para ser empleadas en diagnóstico serológico, como en los casos de hepatitis B, HPV y parvovirus. En los casos en los que no es posible multiplicar virus *in vitro* (HPV es un buen ejemplo), las VLPs expresadas por técnicas recombinantes ofrecen una gran oportunidad para establecer sistemas de diagnóstico serológico. Ya que estas partículas muestran cantidades pronunciadas de determinantes antigénicos, en particular aquellos de naturaleza conformacional especialmente importantes para la detección de anticuerpos contra virus, tienen una ventaja decisiva respecto de las proteínas monoméricas. Además, las VLPs son de fácil enriquecimiento y purificación en el laboratorio.

Como se mencionó anteriormente, el uso potencial de las VLPs como vacunas se estableció con la expresión en levaduras de partículas compuestas del antígeno core del VHB. Los epitopes virales son presentados en contexto de antígenos de

histocompatibilidad clase I y II y pueden inducir la producción tanto de anticuerpos como de células T citotóxicas, confiriendo así protección contra la infección viral. De esta manera pudo demostrarse protección al menos parcial usando las proteínas *core* de los VHB humanos y de marmota (Murray *et al.*, 1984; Schödel *et al.*, 1993).

La mayor razón por la que se intentaron crear VLPs quiméricas para su uso en vacunas se basó en la notoriamente baja inmunogenicidad de los péptidos libres. Con la intención de aumentar la baja inmunogenicidad de moléculas con epitopes neutralizantes, estos péptidos se expresaron genéticamente acoplados a VLPs, donde numerosas copias idénticas se presentan sobre una proteína soporte. Esto pudo ser demostrado claramente en partículas quiméricas derivadas de la proteína *core* del VHB con la inserción de un péptido de rinovirus (Francis *et al.*, 1990). Esta proteína fue la primera en ser usada como transportadora de epitopes por varias razones. Fue una de las primeras proteínas virales expresadas al comienzo del desarrollo de la ingeniería genética, pudo ser producida a muy altos niveles y se ensambló correctamente en ausencia de otros componentes virales en muy diferentes especies procariontas y eucariotas, tales como *Escherichia. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonela*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Spodoptera frugiperda*, ovocitos de *Xenopus*, y varios cultivos celulares de mamíferos. Por otro lado, las partículas *core* mostraron una gran inmunogenicidad, ya que fueron capaces de disparar fuertes respuestas inmunes de células B, T colaboradoras y T citotóxicas en primates y roedores. Finalmente, esta proteína mostró una gran flexibilidad y una inesperadamente alta capacidad de aceptar en su secuencia grandes inserciones foráneas. Debido a que sólo aproximadamente un quinto de la molécula de 183 aminoácidos es necesaria para la particulación, pudieron localizarse dentro de la molécula varios sitios de inserción de secuencias foráneas. Estos sitios están localizados en las posiciones aminoterminal -6, -4, 1 y 3, en las posiciones internas 75-81, 77-78, 78-79, 78-82, 81-82 y 82-83 y en las posiciones carboxiternales 144 y 149 (Argos & Fuller, 1988).

En los últimos años se han construido una enorme cantidad de partículas quiméricas utilizando la proteína *core* a partir de muy diferentes fuentes de epitopes foráneos, con inserciones en las posiciones aminoterminal, en las posiciones internas y en las posiciones carboxiternales. A modo de ejemplo, podemos mencionar las siguientes:

Fuente de epitopes	Sistema de expresión	Inserción	Longitud del inserto (aa)	Particulación
FMDV VP1	<i>E. coli</i>	-6	36	no
"	<i>S. cerevisiae</i>	-6	36	si
"	<i>Vaccinia</i>	-6	36	si
HIV1 gp120	<i>E. coli</i>	-6	24	no
HIV1 gp120+p24	<i>E. coli</i>	-6	52	si
HBV preS1	<i>S. typhimurium</i>	81	27	no
HBV preS2	<i>E. coli</i>	83	11	si
HBV HBsAg	<i>E. coli</i>	144	41	si
HIV1 gp41	<i>E. coli</i>	144	20	si
HCV core	<i>E. coli</i>	149	39	si
MCMV pp89	<i>Vaccinia</i>	179	11	si

E. coli fue el sistema más ampliamente difundido para la expresión de estas partículas quiméricas, aunque cuando este sistema falló en formar partículas a partir de determinadas construcciones, se emplearon con éxito otros sistemas eucariotas como *Vaccinia* o *Baculovirus*.

La purificación de las partículas *core* quiméricas se basa principalmente en la utilización de gradientes de sacarosa y CsCl, aunque también se emplearon con éxito cromatografías con Sefarosa CL4B e hidroxapatita.

En el presente está siendo empleada una amplia variedad de sistemas de naturaleza similar para exponer diferentes secuencias peptídicas en la superficie de transportadores altamente organizados capaces de replicación, tales como rinovirus (Ferstanding *et al.* 1994), poliovirus (Almond *et al.* 1990), virus del mosaico de coliflor (Usha *et al.*, 1993) y bacteriófagos. Este último sistema se empleó especialmente para la presentación en superficie de ligandos y fragmentos de anticuerpos, metodología conocida con el nombre general de "phage display" (Parmley & Smith, 1988; Scott & Smith, 1990; Cwirla *et al.*, 1990; Barbas *et al.*, 1991). Esta metodología se basa en la expresión de dominios proteicos expresados en la superficie del fago M13 luego de su fusión a una proteína de pegado del virus (la proteína 3) y permite seleccionar cambios fenotípicos en una determinada función proteica y simultáneamente decodificar el correspondiente fenotipo. Así, para un dado ligando de interés, pueden específicamente seleccionarse fagos con propiedades de pegado particulares presentes en proporciones muy pequeñas de

entre poblaciones muy grandes, permitiendo la selección de los fenotipos de receptor buscados.

Debido a que los sistemas procariotas tienen restricciones respecto de las proteínas que pueden ser expresadas por esta metodología (falta de glicosilación y de plegamiento apropiados), se buscaron alternativas eucariontes para la metodología de "phage display".

Goodman-Snitkoff y colaboradores determinaron que los componentes esenciales mínimos requeridos para estimular una respuesta inmune dirigida contra antígenos peptídicos son la presencia de epitopes B y epitopes T unidos a un soporte hidrofóbico y la formación de complejos entre estos epitopes con otros fosfolípidos y colesterol para presentarlos al sistema inmune en una configuración multivalente (Goodman-Snitkoff *et al.*, 1990).

Como se mencionó anteriormente, *Autographa californica* (AcNPV) es el miembro representativo de *Baculoviridae*, una amplia familia de virus de ADN de doble cadena, envueltos, que infectan insectos y otros invertebrados. Además de su uso como biopesticida, en la actualidad son utilizados como sistema de expresión eucarionte (Summers & Smith, 1987). Durante su ciclo de vida presentan dos fenotipos que tienen roles específicos en la persistencia del virus en la naturaleza: el virus ocluido (OV) y el virus brotado (BV) (Blissard & Rohrmann, 1989; Adams & McClintock, 1991). La forma ocluida (OV) es responsable de la transmisión de la infección de una larva a otra y adquiere su envoltura en el núcleo antes de incorporarse a una matriz proteica constituida mayoritariamente por poliedrina, una proteína codificada por el virus que protege los viriones de la desecación y de los rayos ultravioletas del sol. Los poliedros liberados al ambiente por la licuefacción de insectos infectados y enfermos, son ingeridos por larvas susceptibles, se disuelven en el aparato digestivo por el pH alcalino allí presente y los viriones ocluidos liberados en el lumen del intestino, pueden infectar las células del intestino medio. El virus brotado (BV) es responsable de transmitir la infección de un tejido a otro dentro de un insecto infectado y adquiere su envoltura cuando brota de la membrana plasmática de las células infectadas. Las envolturas de los dos tipos de viriones tienen diferentes especializaciones: las de los BV están especializadas para interacciones con células y tejidos dentro del hemocele del insecto, mientras que las de los OV lo están para la interacción con poliedrina y para la infección de las células epiteliales del intestino medio. Una de las diferencias más importantes

entre ambos tipos de envolturas es la presencia en los BV de la glicoproteína gp64 ausente en los OV. Esta glicoproteína tiene un importante rol en la infectividad, mediando la penetración de los viriones a las células durante la endocitosis absorptiva (Charlton & Volkman, 1993, Volkman & Goldsmith, 1984).

Se ha determinado la secuencia completa de AcNPV (Withford *et al.*, 1989), incluyendo la de gp64. Este gen codifica para una glicoproteína de transmembrana tipo I de 64 kDa con un péptido señal aminoterminal y un dominio carboxiterminal de anclado a membrana. Esta glicoproteína está presente tanto en la membrana de células infectadas como en la superficie de virus brotado, en una forma multimérica (Roberts *et al.*, 1993, Volkman *et al.*, 1984).

Las semejanzas de esta glicoproteína en cuanto a su ubicación y función con la proteína p3 del bacteriófago M13 permitieron vislumbrar su potencial como sistema de expresión de polipéptidos similar al ya descrito *phage display* (McCafferty *et al.*, 1990), metodología que se emplea para seleccionar variantes que expresan secuencias capaces de unión a ligandos particulares de entre poblaciones iniciales muy escasas. Se reportó que la inserción de secuencias foráneas en la porción aminoterminal de una copia duplicada de gp64 no previene el subsiguiente procesamiento de la molécula recombinante, que involucra plegado, secreción y oligomerización con copias salvajes de gp64, permitiendo la presentación de proteínas foráneas sin afectar la viabilidad de los virus recombinantes (Boublik *et al.*, 1995).

La expresión de diferentes sitios antigénicos del VFA sobre la envoltura de baculovirus y en la membrana de las células que éstos infectan plantea una estrategia alternativa para salvar algunos de los inconvenientes para las vacunas clásicas ya mencionadas. Estos virus presentan un restringido rango de huésped y no son capaces de iniciar una infección productiva en plantas o vertebrados. La expresión de antígenos sobre la membrana de los mismos significa un método sencillo de presentación de antígenos de manera particulada, capaces de adoptar estructuras compatibles con epitopes conformacionales, fácilmente purificable y segura.

Además, la inserción de secuencias codificantes para proteínas citoplasmáticas en el marco de una glicoproteína de membrana puede permitir que dichas secuencias se presenten en la membrana de células de insecto. Existen antecedentes que muestran que ciertas glicoproteínas de membrana derivadas de virus envueltos

tales como el Herpes simplex virus tipo 1 o el virus de la leucemia felina expresadas en células infectadas pueden proteger animales de experimentación cuando éstos son vacunados con las mismas células infectadas (Ghiasi *et al.*, 1996; Wardley *et al.*, 1992). La misma metodología podría ser entonces empleada con éxito a proteínas quiméricas constituidas por inserciones en la secuencia de gp64 de proteínas enteras o sitios antigénicos derivados de proteínas citoplasmáticas, como el caso de las proteínas de cápside derivadas del VFA.

II. Hipótesis

HIPÓTESIS

1. La vacunación con sitios antigénicos derivados del VFA C3Arg85 puede proteger animales susceptibles contra el desafío viral
2. Es posible expresar el sitio antigénico A del VFA C3Arg85 fusionado a la proteína *core* del VHB en sistemas procarióticos y eucarióticos, permitiendo su multimerización y la exposición de los epitopes foráneos de manera particulada y multimérica.
3. Es posible expresar la proteína precursora P1 en sistemas procarióticos y eucarióticos. Esta proteína puede adoptar conformaciones espaciales que imiten epitopes discontinuos presentes en la partícula viral.
4. LA fusión de estos sitios antigénicos al extremo amino terminal de la glicoproteína gp64 del baculovirus AcNPV no afecta su localización en la membrana de células de insecto infectadas, permitiendo exponer estos sitios foráneos en la superficie celular.
5. Las diferentes proteínas de fusión gp64-VFA no afectan su localización en la membrana de los baculovirus recombinantes ni su capacidad de replicación, permitiendo la exposición de epitopes de interés en la superficie de los viriones.

III. Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Diseñar racionalmente vacunas contra la fiebre aftosa mediante la expresión de sitios antigénicos simples y antígenos complejos derivados del virus de la fiebre aftosa del serotipo C3 en diferentes sistemas de expresión con el propósito de aumentar su inmunogenicidad.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Expresar el sitio antigénico A del virus de la fiebre aftosa del serotipo C3 fusionado a la proteína multimérica *core* del virus de la hepatitis B y evaluar sus características físicas, antigénicas e inmunogénicas.

- Expresar diferentes versiones de la poliproteína precursora P1 y evaluar la presentación de epitopes discontinuos como sus propiedades inmunogénicas.

- Expresar ambos antígenos en la superficie de baculovirus y en la membrana de células de insecto infectadas, evaluar su localización, su correcta conformación, sus propiedades antigénicas e inmunogénicas.

IV. Materiales y Métodos

1. Oligonucleótidos

Se sintetizaron en un equipo Applied Biosystems Mod. 381 A utilizando el método basado en el uso de fosforamiditas.

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se resumen en la siguiente tabla:

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA
A-138	GATTAC <u>AGATCTCCACCATGGCCT</u> ACTGCTGGTGC GCGTAGGGGAGACCTAGCC
A-138Xma	TATAC <u>CCGGGGATCTCCACCATGGCCT</u> ACTGCTG GTGCGCGTAGGGGAGACCTAGCC
A-156	TATCTATAGATCTGCAGGGCGTGTGCCGCCGCCAGA TGGGCTAGGTCTCCCCTACG
core-Met	TATTAGATCTAGCATGGACATCGACCCTTAT
core-Stop	TATTAGATCTTCAACATTGAGATTCCCGAGA
SIG-1	GCGCAGATCTATGCTACTAGTAAATCAGTCA
SIG-2	ATATCTGCAGAATTCCCGGGCGCAAAGGCAGAATGC GCCGCCG
GP64-1	CGCGCTGCAGGGCGGAGCACTGCAACGCGCAAATG
GP64-2	GCGCAGATCTTTAATATTGTCTATTACGGTT
P1Mir	12 TCAGGGATCCAATATGGGAGCCGGGCAATCCAG CCCGGCG
P1Neg	13 AATTGGATCCTTACAGCAGTTGTTTCGCCGGTGC GA
P1-1	14 GCGCCCCGGGAGCCGGGCAATCCAGCCCG
P1-2	GCGCCTGCAGCAGTTGTTTCGCCGGTGC
P1-2A	CGTCGGATCCTCTAGATTACCCAGGGTTGGACTCGA CGTC

En letra subrayada se señalan los sitios de restricción incorporados a la secuencia de los oligonucleótidos. En negrita se señalan los codones de iniciación (ATG) y el triplete complementario a los de terminación (TTA)

2. Cepas bacterianas

Para las estrategias de clonado se utilizó la cepa DH5 α de *Escherichia coli*, cuyo genotipo es el siguiente :

supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ (lacIZYA-argF)U169 deoR (ϕ 80dlac Δ lacZ)

M15.

Los cultivos líquidos se realizaron en medio LB (5 g/l Triptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl), con agitación constante de 100 rpm a 37°C.

Para los experimentos de expresión se utilizó la cepa BL21(DE3) de *Escherichia coli*, cuyo genotipo es el siguiente :

F⁻ ompT[lon] hsdS_B (r_B⁻ m_B⁻, una cepa B de *E. coli*) con DE3, un profago λ que lleva el gen de la enzima T7 ARN polimerasa.

3. Virus

El baculovirus utilizado en este trabajo fue el virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* (AcNPV). Su multiplicación se realizó en células Sf9 crecidas en forma de monocapa a 27°C.

Se utilizó el virus C3 Argentina/85 (Piccone y col., 1988) provisto por GELAB/SENASA, obtenido de epitelio lingual bovino. Este virus fue aislado en Marcos Juárez, Córdoba, en diciembre de 1984 y forma parte de la vacuna antiaftosa desde 1985 hasta la fecha. Se amplificó mediante no más de tres pasajes en células de la línea BHK-21 clon 13.

El virus de desafío fue provisto por la empresa Biogénesis S.A.

4. Células

Se utilizaron las células de insecto de la línea Sf9 (ATCC) derivada de tejido ovárico de *Spodoptera frugiperda*. Las células se crecieron a 27°C en forma de monocapa o de cultivos en suspensión en medio TNM-FH (Sigma) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y una solución de antibiótico-antimicótico (Gibco).

Se utilizaron también células BHK-21 clon 13, que se multiplicaron a 37°C en frascos rotatorios de 2 litros, en medio de cultivo mínimo esencial de Eagle (MEM-Eagle, Gibco) tampomado con *buffer* Hepes 25 mM, suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco) y 50 µg/ml de Gentamicina (Gibco).

5. Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones hembra de la cepa BalbC de 2 meses de edad. Los animales fueron provistos por el Bioterio del INTA.

6. Anticueros monoclonales

Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron cedidos por el Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, España; por el Centro Panamericano de Fiebre Aftosa, Río de Janeiro, Brasil y por el Instituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e delle Emilia, Brescia, Italia.

Se utilizó un panel de 17 anticuerpos monoclonales, de los cuales 9 están dirigidos contra el sitio A, 7 están dirigidos contra el sitio D y 1 no está mapeado, el anticuerpo monoclonal no neutralizante 7BH11 que reconoce un epítipo discontinuo conservado en todas las cepas de VFA de serotipos A, O y C testeadas hasta el momento. El anticuerpo monoclonal AcV5 dirigido contra un epítipo de la glicoproteína gp64 del baculovirus AcNPV fue cedido gentilmente por el Dr. Gary Blissard.

Anticuerpo	Isotipo	Proteína reconocida	Neutralización	Epítipo reconocido
2LC9	n.d.	VP1(sitioA)	+	C
7AB5	IgG3	VP1(sitioA)	+	C
7AH1	n.d.	VP1(sitioA)	+	C
7CA11	IgG1	VP1(sitioA)	+	C
7CA8	IgG3	VP1(sitioA)	+	C
7EE6	IgG3	VP1(sitioA)	+	C
7FC12	IgG1	VP1(sitioA)	+	C
7JD1	IgG1	VP1(sitioA)	+	C
7JD1	IgG1	VP1(sitioA)	+	C
4D7	IgG1	VP1,VP2,VP3	+	D
1G5	IgG2b	VP1,VP2,VP3	+	D
3E9	IgG2b	VP1,VP2,VP3	+	D
2E5	IgG1	VP1,VP2,VP3	+	D
5C4	IgG2b	VP1,VP2,VP3	+	D
7BH11	IgG2b	n.d.	-	n.d.
2A12	IgG3	VP1,VP2,VP3	+	D
1G5	IgG2b	VP1,VP2,VP3	+	D

C: continuo

D: discontinuo

n.d. no determinado

7. Metodología de ADN recombinante

Todas las técnicas de ADN recombinante se realizaron de acuerdo a las ya

descritas y publicadas en forma de manual (Maniatis *et al.*, 1989).

Las enzimas de restricción y las enzimas modificantes fueron provistas por New England Biolabs, a menos que se especifique lo contrario.

La enzima T4 ADN ligasa y su *buffer* fue provista por New England Biolabs.

La enzima Taq ADN polimerasa y los dNTPs fueron provistos por PROMEGA.

Todos los productos se usaron según especificaciones de sus fabricantes.

7.1. Preparación de ADN plasmídico de alta calidad

Se utilizaron las columnas de intercambio aniónico comerciales QIAPREP. La purificación del ADN plasmídico se realizó a partir de 3 ml de cultivo saturado de bacterias transformadas, rindiendo aproximadamente una cantidad de 2 µg de ADN, que fue eluído de la columna con una solución de Tris-HCl 10mM pH 8.

7.2. Digestión con enzimas de restricción

Para las digestiones de los diferentes plásmidos se utilizaron 500 ng de ADN, 5 U de enzima, *buffer* de restricción apropiado y un volumen final de 30 µl. Las reacciones se incubaron de 2 a 3 h a la temperatura recomendada.

7.3. Obtención de extremos 5' romos

Para el rellenado de extremos 5' protruyentes obtenidos por restricción con las enzimas BamHI, BglII y Styl se utilizaron 5 U del fragmento Klenow de la enzima ADN polimerasa I, dNTPs a una concentración final de 180 µM y cualquiera de los *buffers* de reacción de digestión. La reacción se incubó 15 min a temperatura ambiente y, de ser necesario, la enzima se inactivó por incubación a 75°C por 10 min.

7.4. Defosforilación de los extremos 5' fosfato

La reacción de remoción de los grupos fosfato de los extremos 5' de los plásmidos digeridos se realizó utilizando 5 U de la enzima fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP) agregadas directamente al volumen de reacción de digestión. La reacción se incubó por 30 min a 37°C para extremos 5' protruyentes o a 50°C por 1 h para extremos romos o 3' protruyentes. Luego de la reacción, se inactivó la enzima y se purificó el ADN plasmídico según se describe en el ítem 6.5.

7.5. Electroforesis en geles de agarosa

Se realizaron geles de agarosa de concentraciones entre 0,8% y 1,5%. Los geles se corrieron en *buffer* TAE (Tris-acetato 10mM, EDTA 1mM) a 5-10 V/cm a temperatura ambiente. Para visualizar las bandas de ADN se utilizó bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml de gel.

Para sembrar las muestras se utilizó un *buffer* de siembra de concentración 5 X (glicerol 50%, TAE 5 X, azul de bromofenol 1%).

Los geles se fotografiaron utilizando un equipo Fotodyne y el programa Cricket Graph.

7.6. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

Las bandas de ADN resueltas mediante electroforesis en geles de agarosa se escindieron del gel con bisturí y se purificó el ADN utilizando el kit *Qiaex purification system* (QIAGEN). El ADN obtenido se resuspendió en una solución de Tris-HCl 10 mM pH 8.

7.7. Reacciones de ligado molecular

Para el ligado molecular de los diferentes insertos a los plásmidos correspondientes, se utilizaron entre 50 y 100 ng de vector y diferentes relaciones molares vector:inserto (0,5:1, 1:1, 1:2 y 1:5). La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 µl, en presencia de *buffer* de ligado y 1 U de enzima T4 ADN ligasa para ligar extremos romos o 0,1 U de enzima para ligar extremos cohesivos. La reacción se incubó a 16°C toda la noche, incluyendo un control de vector sin inserto para estimar el aporte de vector sin digerir o religado al número de colonias transformantes.

7.8. Marcación radioactiva de sondas

Se realizó mediante el método de iniciación al azar de la polimerización, empleando el kit comercial *Oligolabelling kit* de PROMEGA, siguiendo las recomendaciones de sus fabricantes. Los fragmentos de ADN a utilizar como sondas se obtuvieron como se indica en la siguiente tabla:

sonda	obtención
core	Digestión del plásmido pHBV con Styl y purificación por gel de agarosa
P1	Digestión del plásmido pUCP1 con BamHI y purificación por gel de agarosa
gp64	PCR con los oligonucleótidos GP64-1 y GP 64-2

Se usaron 50 ng de ADN, que se desnaturalizaron por calentamiento a 100°C por 2 min. Como nucleótido radioactivo se empleó [³²P]α-dCTP (10μCi/μl; 3000 Ci/mmol) y 1μl del fragmento Klenow de la enzima ADN pol I (1 U/7μl). La reacción se incubó 1 h a 37°C, y se eliminó la radioactividad no incorporada a la sonda mediante cromatografía de tamiz molecular a través de columnas de 1 ml de Sephadex G-50. Para el caso particular de la sonda sitio A, se hibridaron los oligonucleótidos A-138 y A-156 y se llenaron los segmentos simple cadena con 1μl del fragmento Klenow de la enzima ADN pol I en presencia de [³²P]α-dCTP como nucleótido radioactivo. Antes de agregarse al *buffer* de hibridación, la sonda se desnaturalizó por calentamiento a 100°C por 1 min y se mantuvo en hielo por 2 min.

7.9. Transformación de bacterias

Las bacterias se hicieron competentes para la transformación mediante el método de Hanahan (1985) y se mantuvieron congeladas a -70°C hasta su uso. Entonces se descongelaron y se mantuvieron en hielo por 10 min. A 50 μl de bacterias se agregaron de 1 a 3 μl del producto de las diferentes reacciones de ligado, se mezcló por pipeteo y se incubó en hielo por 30 a 45 min. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42°C por 1,5 min y se dejó en hielo por 2 min adicionales. Se agregaron luego 200 μl de medio LB, se incubó con agitación suave a 37°C y se plaqueó entonces en medio LB agarizado conteniendo ampicilina a una concentración final de 100 μg/ml. Las placas se incubaron a 37°C toda la noche, y las colonias se picaron con escarbadiantes estetilizados, que se usaron para inocular cultivos de 3-5 ml de LB/ampicilina.

7.10. Minipreparaciones de ADN

Se utilizó el método de Birnboim y Doly (1979) con ligeras modificaciones. Se partió de 5 ml de cultivo de bacterias en medio LB/Ampicilina crecido toda la noche a

37°C. Se cosecharon las bacterias por centrifugación a 10.000 x g en microcentrífuga de mesa y se resuspendieron en 100 µl de Solución I (Tris-HCl 25 mM pH8, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM). Tras una incubación de 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 200 µl de Solución II (NaOH 0,2 N, SDS 1%). Se mezcló suavemente por inversión y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 150 µl de Solución III (acetato de potasio 3M) fría, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó el floculado a 12.000 x g y se realizó una extracción orgánica del sobrenadante mezclándolo con un volumen de fenol-cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se recuperó la fase acuosa y se agregó 1/10 del volumen de acetato de sodio 3M pH 5,2, 2 volúmenes de etanol y se incubó 20 min a -70°C. Se precipitó el ADN por centrifugación a 12.000 x g por 15 min, se enjuagó el precipitado con etanol 70%, se secó bajo vacío y se resuspendió en 50 µl H₂O conteniendo ARNasa (100 µg/ml).

Para verificar la presencia, integridad y orientación de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digirieron de 1 a 3 µl de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas.

8. Secuenciación de ADN

Se realizó mediante el método de los terminadores de cadena (Sanger, 1977), empleando el kit de secuenciación *fmol Sequencing kit* de PROMEGA.

Cada reacción se realizó a partir de 500 ng de ADN plasmídico de calidad apta para secuenciación, 50 ng de oligonucleótido iniciador y 5 µCi de [³⁵S]-dATP, siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

Los productos de las reacciones de secuenciación se resolvieron en geles de poliacrilamida 6% desnaturalizantes (acrilamida 6%, bisacrilamida 0,3%, urea 42%, TBE 0,5%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,005%) de 40 X 35 cm usando un gradiente de *buffer* 0,5-1 x TBE (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). La electroforesis se realizó a una potencia constante de 50 W, y los geles se fijaron en una solución de metanol 5%-ácido acético 5% y secaron bajo vacío a 80°C. Se obtuvieron las autorradiografías exponiendo los geles a películas autorradiográficas X-O-Mat (Kodak) por 24-48 h a temperatura ambiente.

9. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 10%, 12% y 15%, dependiendo del tamaño de la proteína de interés a ser visualizada. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 29:1. En general se utilizaron minigeles (8 x 8 cm), los que se corrieron a una corriente constante de 150 V, en *buffer* Tris-glicina-SDS (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1%).

La composición de los geles fue la siguiente:

	Gel concentrador	Gel separador		
		10%	12%	15%
Acrilamida-bisacrilamida 30%	0,83 ml	3,3	4 ml	5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	0,63 ml	-	-	-
SDS 10%	50 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
H ₂ O	3,4 ml	4 ml	3,3 ml	2,3 ml
APS 10%	25 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se tiñeron con el colorante azul de Coomassie o se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para experimentos de *Western-blot*.

10. Tinción con el colorante azul de Coomassie

Se incubaron los geles en una solución de azul de Coomassie 0,05% (Coomassie Brilliant Blue R 250 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1 a 2 h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante mediante incubación con suave agitación con solución de lavado (metanol 50%, ácido acético 10%), que se reemplazó periódicamente. El gel se decoloró hasta que el fondo fuera incoloro y las bandas proteicas se visualizaran con nitidez.

11. Identificación de proteínas mediante *Western-blot*

11.1. Electrotransferencia

Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se equilibraron por 20 min con *buffer* de transferencia (Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, metanol 20%). Entonces se cortó un rectángulo de nitrocelulosa (S&S BA 85 0,45 μ m, *Schleicher & Schuell*) de tamaño algo mayor que el del gel, se hidrató 5 min en H₂O y 5 min en *buffer* de transferencia y se dispusieron sobre el la cara del *cassette* de transferencia correspondiente al electrodo negativo (Bio-Rad) 1 esponja del tipo *Scotch Brite* (Bio-Rad), 2 papeles de filtro *Whatmann* 3MM, el gel de poliacrilamida, el filtro de nitrocelulosa, 2 papeles de filtro *Whatmann* 3MM y 1 esponja del tipo *Scotch Brite*. Se montó el *cassette* dentro de la cuba de transferencia (Bio-Rad), se llenó con *buffer* de transferencia y se transfirieron las proteínas del gel al filtro de nitrocelulosa aplicando una corriente constante de 200 mA a 4°C por 1,5 h.

11.2. Detección inmunológica de las proteínas

Luego de la transferencia, los filtros se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo TBS-Tween-leche (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 5%). Luego del bloqueo, se lavaron con la solución de lavado TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%) y se incubaron con diluciones apropiadas de los anticuerpos específicos (1:500 para el anticuerpo de conejo anti *core* del VHB, AXELL y 1:200 para un *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A del VFA, Centro Panamericano de Zoonosis, ver ítem 6) en *buffer* de dilución TBS-Tween-leche (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%, leche descremada 3%). Tras 1,5 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se recuperó la dilución de anticuerpo y se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 15 min cada vez. Se incubaron entonces con una dilución 1:1500 en *buffer* de dilución de un segundo anticuerpo apropiado (cabra anti conejo conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (KPL) o cabra anti ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina (KPL). Tras 1,5 h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se descartó la dilución del 2° anticuerpo y se lavaron los filtros 3 veces con solución de lavado TBS-Tween por 15 min cada vez. Se realizó entonces un último lavado de 10 min

con el *buffer* de revelado de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM) y se agregaron 10 ml de solución de revelado (10 ml de *buffer* de revelado, 66 µl de Nitro blue tetrazolium, NBT, 50 mg/ml en dimetilformamida 70%, Gibco-BRL y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato, BCIP, 50 mg/ml en dimetilformamida 100%, Gibco-BRL). Se incubó con agitación suave por 3 a 15 min con luz tenue, hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con H₂O y los filtros se secaron al aire y se guardaron al resguardo de la luz.

12. Construcción de los plásmidos de transferencia para baculovirus

12.1. Construcción del plásmido pVLcore

Se digirió el vector pETHBV que contiene el genoma del virus de la Hepatitis B (cepa ayw) con la enzima de restricción Styl, liberando un fragmento de 581 pb codificantes para la proteína *core*. Se llenaron los extremos protruyentes con el fragmento Klenow de la enzima ADN pol I, se resolvió una banda del peso molecular esperado mediante electroforesis de agarosa 1% y se purificó el ADN.

Por otro lado, se digirió el plásmido de transferencia pVL-1393 con las enzimas de restricción BamHI y BglII, se rellenaron los extremos protruyentes con el fragmento Klenow de la enzima ADN pol I y se purificó el ADN de igual manera a la ya descrita. Ambas especies se ligaron molecularmente en una relación molar de 1 :1.

Con 3 µl de la reacción se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α y se seleccionaron las bacterias transformadas mediante plaqueo en medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

12.2. Construcción del plásmido pVLcore-A

Formación del dúplex codificante para el sitio A

Se incubaron 1 µg de los oligonucleótidos sitio A 138 y sitio A 156 en presencia de 1X *buffer* T7 DNA pol (0,4 M Tris-HCl pH 8 ,1 M MgCl₂ 0,1 M NaCl 50 mM DTT 0,5 g/ml BSA), en un volumen final de 20 µl, 5 min a 70°C y 5 min a 60°C.

Los segmentos simple cadena se rellenaron con 10 U de la enzima T7 DNA pol

(Sequenase) en presencia de 125 μM de dNTPs por 30 min a 37°C. La enzima se inactivó incubando la reacción 10 min a 70°C y el dúplex se digirió con 40 U de la enzima de restricción BglIII por 2 h a 37°C en un volumen final de 100 μl .

Luego de sucesivas extracciones con 1 volumen de fenol, fenol-cloroformo y éter, se precipitó el ADN con 400 μl de etanol absoluto y 100 μl de acetato de amonio 4M por dos veces consecutivas, y se resuspendió finalmente en 10 μl de H_2O .

Clonado del dúplex en el plásmido pVL-core

Se digirió el plásmido pVL-core con la enzima de restricción BamHI, se removieron los grupos 5'fosfato, se separó por electroforesis y se purificó una banda de ADN del peso molecular esperado por los métodos antes citados. Éste vector y del dúplex sintético codificante para el sitio A preparado y digerido como se describe en el ítem 12.1 se ligaron molecularmente en una relación molar de 1:1 y con 3 μl de la reacción se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5 α y se seleccionaron las bacterias transformadas mediante plaqueo en medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$.

12.3. Construcción del plásmido pVLP1Mir

Extracción de ARN viral de sobrenadante de células infectadas

A 200 μl del sobrenadante de células en cultivo infectadas con VFA a una multiplicidad de infección (moi) de 10 se agregaron 10 μl de SDS al 10% y 20 μl de proteinasa K (10 mg/ml, Sigma), se incubaron a 37°C durante 20 min y luego a 45°C durante 10 min para inactivar la proteinasa K. A continuación se realizaron dos extracciones fenólicas y se recuperó la fase acuosa. El ARN viral se precipitó a -20°C durante 1 h agregando 1 μl de ARN de transferencia (Sigma) como *carrier* y 2 volúmenes de etanol 100% frío. Las muestras se centrifugaron durante 20 min a 12.000 revoluciones por minuto (rpm) y a 4°C, el precipitado se lavó con etanol 70% frío, se secó al vacío y se resuspendió en 50 μl de agua-DEP (Dietil pirocarbonato). El ARN se precipitó nuevamente agregando 10 μl de TNE 10 X (1M NaCl, 100mM Tris-HCl, 10mM EDTA) y dos volúmenes de etanol frío e incubando a -20°C durante 1 h. La muestra se centrifugó a 4°C por 20 min, el precipitado se lavó con etanol

70%, se secó por vacío y se resuspendió en 50 μ l de agua-DEP. Luego, se agregaron 50 μ l de acetato de amonio 5M y 250 μ l de etanol 100 frío y se precipitó el ARN a -20°C durante 1 h. Se recogieron los precipitados por centrifugación, se lavaron con etanol 70%, se secaron y se resuspendieron en 50 μ l de agua-DEP.

Síntesis de ADN complementario (ADNc)

A partir del ARN obtenido de sobrenadante de células infectadas se sintetizó el ADN copia mediante una reacción de retrotranscripción (RT). Para ello, a 200 ng de ARN se le agregaron 200 ng del oligonucleótido P1 Low de polaridad opuesta a la del ARN viral, en un volúmen final de 10 μ l. La reacción se incubó durante 2 min. a 90°C para desnaturalizar el ARN, durante 5 min. a la temperatura de hibridación específica para el oligonucleótido utilizado y finalmente se enfrió en hielo. Se preparó una mezcla de un volúmen final de 90 μ l con 10 μ l de *buffer* RT/Taq (500mM Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂ y 50 mM DTT), 4 μ l de deoxinucleótidos 5mM, 0,5 μ l de la enzima transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (200U/ μ l, Gibco) y agua -DEP que se agregó a la mezcla de ARN y oligonucleótido. La reacción se incubó durante 1 hora a 37°C y luego se hirvió 1 min para inactivar la enzima.

Amplificación de la secuencia codificante para la poliproteína P1

El fragmento de ADN que contiene la secuencia codificante para las 4 proteínas estructurales del VFA se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos P1Mir y P1Low.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

desnaturalización inicial		5 min, 94°C
30 ciclos	desnaturalización	1 min, 94°C
	hibridación	1 min, 58°C
	elongación	2 min, 72°C
elongación final		10 min, 72°C

El fragmento de 2196 pb se purificó mediante columnas comerciales y se digirió con la enzima de restricción BamHI.

Clonado de la secuencia P1 en el plásmido pVL1393

El fragmento P1 digerido se ligó molecularmente al plásmido pVL1393 digerido con la misma enzima y defosforilado. Con 3 μ l de esta reacción se transformaron bacterias DH5 α competentes y se seleccionaron las transformantes mediante plaqueo en medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 μ g/ml.

12.4. Construcción del plásmido pVLP1Mir-2A

A partir de sobrenadante de células infectadas se obtuvo ARN viral como se detalló en el ítem anterior. A partir de este ARN se preparó ADNc utilizando el mismo procedimiento al ya descrito, pero empleando esta vez el oligonucleótido de polaridad negativa P1-2A.

Amplificación de la secuencia codificante para la poliproteína P1-2A

El fragmento de ADN que contiene la secuencia codificante para las 4 proteínas estructurales y el polipéptido 2A del VFA se obtuvo mediante PCR con los oligonucleótidos P1Mir y P1-2A.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

desnaturalización inicial		5 min, 94°C
30 ciclos	desnaturalización	1 min, 94°C
	hibridación	1 min, 58°C
	elongación	2 min, 72°C
elongación final		10 min, 72°C

El fragmento de 2240 pb se purificó mediante columnas comerciales y se digirió con la enzima de restricción BamHI.

Clonado de la secuencia P1-2A en el plásmido pVL1393

El fragmento P1-2A digerido se ligó molecularmente al plásmido pVL1393 digerido con la misma enzima y defosforilado. Con 3 μ l de esta reacción se transformaron bacterias DH5 α competentes y se seleccionaron las transformantes mediante plaqueo en medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina a una

concentración de 100 µg/ml.

12.5. Construcción del plásmido pVLSig

Obtención de la secuencia codificante para el péptido señal de gp64

Se amplificó por PCR la secuencia codificante para el péptido señal de la glicoproteína gp64 del baculovirus AcNPV, empleando 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos SIG-1 y SIG-2 y 100 ng de ADN viral como templado. La reacción se realizó en un volumen de 100 µl conteniendo 1X *buffer* Taq, 200 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ y 0,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa (Promega).

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

desnaturalización inicial		5 min, 94°C
30 ciclos	desnaturalización	1 min, 94°C
	hibridación	30 seg, 48°C
	elongación	30 seg, 72°C
elongación final		10 min, 72°C

Clonado de la secuencia señal de gp64 en el plásmido pVL1393

El producto de amplificación de 114 pb se digirió con las enzimas de restricción PstI y BamHI y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa 1,5% en *buffer* TAE %. Se purificó el ADN utilizando el kit QIAEX II Gel Extraction kit (QIAGEN) y se ligó molecularmente al plásmido pVL1393 digerido con las mismas enzimas.

12.6. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupl

Obtención de la secuencia codificante para la proteína gp64 madura

Se amplificó por PCR la secuencia codificante para la glicoproteína gp64 del baculovirus AcNPV, empleando 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos GP64-1 y GP64-2 y 100 ng de ADN viral como templado. La reacción se realizó en un volumen de 50 µl conteniendo 1X *buffer* Taq, 200 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ y 0,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

desnaturalización inicial		5 min, 94°C
30 ciclos	desnaturalización	1 min, 94°C
	hibridación	30 seg, 48°C
	elongación	30 seg, 72°C
elongación final		10 min, 72°C

Clonado de la secuencia gp64 en el plásmido pVLSig

El producto de amplificación de 1477 pb se digirió con las enzimas de restricción PstI y BglII y se resolvió mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE %. Se purificó el ADN y se ligó molecularmente al plásmido pVLSig digerido con las mismas enzimas.

12.7. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupA

Formación del dúplex codificante para el sitio A

Se realizó de manera idéntica a la descrita en el ítem 7.2, pero utilizando el oligonucleótido A-138Xma en lugar del oligonucleótido A-138. El dúplex se digirió con 20 U de cada una de las enzimas de restricción XmaI y PstI por 2 h a 37°C en un volumen final de 100 µl.

Luego de sucesivas extracciones con 1 volumen de fenol, fenol-cloroformo y éter, se precipitó el ADN con 400 µl de etanol absoluto y 100 µl de acetato de amonio 4M por dos veces consecutivas, y se resuspendió finalmente en 10 µl de H₂O.

Clonado del dúplex codificante para el sitio A en el vector pVLSupI

Se digirió el plásmido pVL-SupI con las enzimas de restricción XmaI y PstI, se removieron los grupos 5' fosfato y se aisló y purificó una banda de ADN correspondiente al plásmido lineal. Se ligaron molecularmente 100 ng totales de este vector y del dúplex sintético codificante para el sitio A en una relación molar de 1:1 y con 3 µl de la reacción se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α y se seleccionaron las bacterias transformadas mediante plaqueo en medio LB-agar conteniendo el antibiótico ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

12.8. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupP1

Obtención de la secuencia codificante para la proteína P1

La secuencia codificante para la poliproteína P1 del VFA se amplificó por PCR, empleando 100 ng de cada uno de los oligonucleótidos P1-1 y P1-2 y 100 ng de ADN del plásmido pRSETP1 como templado. La reacción se realizó en un volumen de 50 μ l conteniendo 1X *buffer* Taq, 200 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ y 0,5 U de la enzima Taq ADN polimerasa.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

desnaturalización inicial		5 min, 94°C
30 ciclos	desnaturalización	1 min, 94°C
	hibridación	30 seg, 53°C
	elongación	30 seg, 72°C
elongación final		10 min, 72°C

Clonado de la secuencia P1 en el plásmido pVLSupI

El producto de amplificación de 2196 pb se digirió con las enzimas de restricción PstI y XmaI y se aisló mediante electroforesis en gel de agarosa 1% en *buffer* TAE. Se purificó el ADN y se ligó molecularmente al plásmido pVLSupI digerido con las mismas enzimas.

13. Obtención de baculovirus recombinantes por cotransfección

Se mezclaron 0,5 μ g de ADN viral (BaculoGold™ DNA, PharMingen) con 2,5 μ g de ADN plasmídico en un tubo de microcentrífuga. La mezcla se incubó 5 min a temperatura ambiente, y se agregó 1 ml de *buffer* de transfección B (125 mM Hepes pH 7,1, 125 mM CaCl₂, 140 mM NaCl).

Se agregó 1 ml de *buffer* A (medio de cultivo Grace's, Sigma, con 10% de SFB) a monocapas de células Sf9 crecidas en frascos de 25 cm² a una densidad de 2×10^6 y a las que se les removió el medio de cultivo.

Sobre su superficie se agregó gota a gota la mezcla ADN-*buffer* B, moviendo el frasco hacia atrás y adelante. Se incubaron los frascos por 4 h a 27°C, se removió el medio de transfección y se agregaron 4 ml de medio TNM-FH-10% SFB. Tras 5

días de incubación a 27°C se colectaron los sobrenadantes en forma estéril, se clarificaron por centrifugación a 1000 X g a 4°C y se mantuvieron refrigerados hasta su uso.

14. Clonado viral

Se realizó mediante el método de dilución a punto final. Brevemente, se agregaron 100 µl de diluciones desde tal cual a 10⁻⁵ de los sobrenadantes de transfección sobre monocapas de células Sf9 crecidas en placas de 96 pocillos a una densidad de 10⁴ células/pocillo, empleando 12 pocillos por dilución, y dejando de 10 a 11 pocillos sin infectar (control negativo). Tras 5 días de incubación a 27°C, se retiraron los sobrenadantes de cada pocillo y se guardaron a 4° C en placas de 96 pocillos. Sobre 1 pocillo se agregaron 50 ng de ADN plasmídico conteniendo el inserto correspondiente (control positivo). Las células adheridas a los pocillos se lisaron agregando 100 µl de NaOH 0,5M por 5 min a temperatura ambiente y se neutralizó agregando 100 µl de acetato de amonio 1,2 M. El ADN obtenido se inmovilizó mediante aplicación de vacío a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell), los que luego se calentaron por 2 hs a 80°C bajo vacío.

15. Dot-blot de ADN

Se prehibridaron los filtros de nitrocelulosa con 10 ml de *buffer* de prehibridación por 2 h a 42°C y se hibridaron entonces con 100 ng una sonda de ADN previamente desnaturalizada, correspondiente a la secuencia *core* del VHB (para los baculovirus AcNPV-C o AvNPV-CA), a la secuencia P1 del VFA (para el baculovirus AcSupPI), a la secuencia del sitio A del VFA (para el baculovirus AcSupA) o a secuencias derivadas de gp64 (para el baculovirus AcSupI), marcadas radioactivamente en 10 ml de *buffer* de hibridación, a 42°C toda la noche. Se lavaron los filtros tres veces con 2X SSC-0,1% SDS a temperatura ambiente, tres veces a 65°C y se expusieron por 5 a 16 h a -70°C a películas autorradiográficas X-O-Mat (Kodak) con pantalla intensificadora.

16. Amplificación de stocks virales

Se infectaron 2 x 10⁶ células Sf9 crecidas en frascos de 25 cm² con 100 µl de los sobrenadantes de transfección. Luego de 1 h de adsorción, se agregaron 4 ml de

medio de cultivo-SFB y se incubaron las células por 3 días a 27°C.

Con 1 ml del sobrenadante se repitió la infección, incubando 5 días a 27°C. Los sobrenadantes de esta última infección se colectaron estérilmente, se clarificaron por centrifugación a 1000 X g a 4°C y se mantuvieron refrigerados hasta su uso.

17. Titulación de stocks virales

Se infectaron monocapas de células Sf9 crecidas en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 células/pocillo con 0,5 ml de diluciones seriadas de stocks virales en medio de cultivo. Tras 1 h de adsorción, se agregaron 3 ml de medio de cultivo-SFB conteniendo 0,5% agarosa SeaKem (FMC) y se incubaron las células por 5 días a 27°C. Sobre la primera capa de medio con agar se agregaron 3 ml de medio con agar conteniendo el colorante vital rojo neutro a una concentración final de 50 µg/ml. Tras dos días de incubación a 27°C, se contaron las placas de lisis y se calculó el título viral, expresado en unidades formadoras de placa por unidad de volumen de stock viral (ufp/ml).

18. Expresión de proteínas recombinantes

Se infectaron 2×10^6 células Sf9 crecidas en frascos de 25 cm² con 100 µl de los diferentes stocks virales a una moi de 10. Tras 1 h de adsorción, se agregaron 4 ml de medio de cultivo-SFB y se incubaron las células por 3-5 días a 27°C.

A diferentes días post infección se descartó el medio de cultivo, se despegaron las células por suaves golpes, se lavaron en *buffer* PBS frío (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 6,2) y se extrajeron las proteínas por incubación por 30 min con el *buffer* de lisis no desnaturizante NP40 (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, Nonodet P-40 1%). Tras una clarificación de 10 min a 5000 x g se mezclaron 50 µl de cada muestra con 50 µl de *buffer* de siembra 2 x (Tris-HCl 100 mM pH 6,8, SDS 4%, azul de bromofenol 0,02%, β-mercaptoetanol 1,8%, glicerol 20%). Se hirvió por 10 min y con 20 µl se sembraron geles de poliacrilamida (10% para evaluar la presencia de la proteína P1 y 15% para las proteínas *core* y *core-A*). Las proteínas resueltas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se detectaron las proteínas de interés mediante experimentos de *Western-blot*.

19. Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de proteína totales se utilizó el kit comercial *Micro BSA Protein Assay Reagent Kit* (Pierce) que emplea el método de Biuret adaptado como micrométodo. La cuantificación se realizó según indicaciones de sus fabricantes.

Para cuantificar proteínas recombinantes visibles en geles de poliacrilamida teñidos con el colorante azul de Coomassie las imágenes de los geles se digitalizaron (Fotodyne) y se determinó la proporción de la proteína recombinante respecto del total mediante el programa de computación NIH.

Para cuantificar proteínas recombinantes no visibles en geles de poliacrilamida, se realizaron experimentos de *Western-blot* revelados con un *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A y se compararon las intensidades de banda usando como patrón distintas concentraciones de proteína P1 producida en bacterias, purificada y cuantificada mediante el kit comercial *Micro BSA Protein Assay Reagent Kit*.

20. Fraccionamiento de proteínas por gradientes de sacarosa

Para evaluar el grado de particulación de las proteínas *core* y *core-A* producido en infecciones con los baculovirus recombinantes, se extrajeron las proteínas de células infectadas con el *buffer* de lisis no desnaturizante NP40 y se ultracentrifugaron los extractos sobre gradientes discontinuos de sacarosa 15%-40%.

Los gradientes se formaron sembrando 5 capas de 2 ml de concentraciones 15%, 21,25%, 27,5%, 33,75% y 40% de sacarosa en *buffer* Tris-NaCl (20 mM Tris, 150 mM NaCl) en tubos de ultracentrífuga de 12 ml. Sobre el gradiente se sembraron 200 μ l de extractos celulares clarificados y se ultracentrifugaron a 35000 rpm por 90 min a 10°C en un rotor TST 41.14. Se fraccionaron los gradientes en 16 fracciones, se mezclaron 50 μ l con un volumen igual de *buffer* de siembra para electroforesis de proteínas, y se evaluó la presencia de proteínas recombinantes en cada fracción mediante experimentos de *Western-blot*.

21. Fraccionamiento de baculovirus mediante gradientes de sacarosa

Se cosecharon 500 ml de sobrenadantes de infecciones de células Sf9 con los baculovirus recombinantes, se clarificaron por dos centrifugaciones sucesivas de 1000 rpm y 10.000 rpm por 10 min en rotor Sorvall GS-3, se filtraron a través de

membranas de 0,2 μm y se concentraron por ultracentrifugación sobre un colchón de sacarosa 25% en NaCl 5 mM-EDTA 10 mM a 32.000 rpm por 1,5 h a 20 °C en un rotor TFT-45.94. El precipitado se resuspendió en 2 ml de PBS pH 6,2, se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa 25%-60% en PBS pH 6,2 y se ultracentrifugó a 32.000 rpm por 2 h a 20°C en un rotor TST-41.14. El gradiente se fraccionó desde el fondo, colectándose 9 fracciones.

22. Inmunofluorescencia de células infectadas

Se lavaron las células infectadas con PBS y se fijaron por 10 min a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) 3,7% en PBS conteniendo 30 mM de sacarosa. Se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron con NH_4Cl 50 mM por 10 min a temperatura ambiente. Se incubaron luego con una dilución 1:100 en PBS-albúmina 1% de un *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A por 15 min a temperatura ambiente. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente con una dilución 1:100 de un segundo anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína. Se lavaron las células 3 veces con PBS y se resuspendieron en DABCO (Sigma) 100 mg/ml en 50% PBS-glicerol 50% preparado en el momento. Se montaron los preparados entre portaobjetos y cubreobjetos y se observaron las células fluorescentes en microscopio de fluorescencia invertido.

23. Formulación de vacunas

Vacunas basadas en extractos proteicos

Los extractos celulares provenientes de células de insecto o las proteínas purificadas a partir de extractos bacterianos se inocularon usando como vehículo adyuvante oleoso (Arlacel A-Marcol 52 [1:7]-1% Tween 40) (Rivenson *et al.*, 1982). Las vacunas se prepararon emulsionando los diferentes extractos en un volumen igual de adyuvante, agregando la fase acuosa sobre la oleosa gota a gota en mortero de porcelana y de manera de contener aproximadamente 100 μg de la proteína P1 expresada en bacterias, y 50 μg de las diferentes proteínas expresadas citoplasmáticamente en el sistema "baculovirus-células de insecto" por dosis de 100 μl .

Vacunas basadas en células de insecto

Las células de insecto infectadas con los baculovirus recombinantes construidas a partir del vector pVLSupI se lavaron con PBS pH 6,2 y se resuspendieron en el mismo *buffer* a una concentración de 10^8 células/ml. Las vacunas se prepararon usando como vehículos adyuvante oleoso, $Al(OH)_3$ o PBS, de manera de contener 10^7 células por dosis en un volumen de 200 μ l.

Para esta clase de vacunas, las suspensiones celulares se emulsionaron empleando vórtex.

Los controles positivos se inocularon con virus aftoso inactivado, a una concentración de 1 μ g de virus inactivado por dosis.

Vacunas basadas en baculovirus recombinantes

Se cosecharon sobrenadantes de células de insecto crecidas en suspensión e infectadas con los baculovirus recombinantes basados en el vector pVLSupI y se clarificaron como se describe en el ítem 23. Los virus se concentraron por ultracentrifugación sobre colchón de sacarosa, se resuspendieron en PBS pH 6,2 y se titularon por ensayo de placa. Las vacunas se prepararon emulsionando los baculovirus recombinantes en adyuvante oleoso, $Al(OH)_3$ o PBS, y de manera de contener 10^8 baculovirus recombinantes por dosis, contenidos en un volumen de 100 μ l.

En todos los casos, las suspensiones virales se emulsionaron empleando vórtex.

24. Vacunación de ratones

Se inocularon ratones con 200 μ l de cada una de las vacunas recombinantes, de placebo o de vacunas convencionales por vía intraperitoneal o subcutánea. Los ratones se revacunaron con dosis de refuerzo periódicas cada 21 días.

25. Evaluación de la respuesta inmune

Titulación de los sueros

Se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante a intervalos regulares post vacunación. Se separó el suero y con diferentes diluciones se determinaron los niveles de anticuerpos anti-VFA mediante ELISA de captura.

Para este ensayo se cubrieron placas de microtitulación (Nunc Maxisorp) con una

dilución 1:200 de un suero de captura (conejo anti-VFA C3Arg85) en *buffer* carbonato/bicarbonato (0,06M; pH9,6). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C, se lavaron con *buffer* TBS-Tween (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Tween 20 0,05%), se bloquearon con leche descremada 5% en TBS-Tween-SE, se lavaron nuevamente y se incubaron por 1 h con sobrenadantes de células BHK lisadas por congelamiento conteniendo VFA en TBS-Tween. Tras lavados con *buffer* TBS-Tween-SE, se agregaron las diluciones de sueros de ratón seriadas al 1/2 y comenzando por 1:50, se incubó por 1 h a 37°C, se lavó la placa con *buffer* TBS-Tween y se incubó a 37°C por 1 h con una dilución 1:1000 de un anticuerpo de cabra anti ratón conjugado con la enzima peroxidasa. Luego de extensivos lavados se reveló la reacción mediante el agregado de ABTS [2-2'-Azino-bis(3-etilbentiazolina-6-ácido sulfónico)] y H₂O₂ en *buffer* citrato pH5. Luego de incubar la placa a 37°C por 15-30 min se leyó la absorbancia a 405 nm.

Ensayos de seroneutralización

Se tomaron muestras de sangre sin anticoagulante a intervalos regulares post vacunación. Se separó el suero y con diferentes diluciones se determinaron los niveles de anticuerpos neutralizantes de VFA.

Los ensayos de neutralización se llevaron a cabo *in vitro* mediante ensayos de reducción del número de placas (Habel, K. 1969) en monocapas de células BHK-21 crecidas a un 80% de confluencia. Se incubaron 200 unidades formadoras de placa de VFA en un volumen de 200µl, con un volumen igual de diluciones seriadas de los sueros de animales inmunizados durante 1 h a temperatura ambiente y 0,5 h a 4°C. Se inocularon 300 µl de las mezclas sobre monocapas de BHK-21 crecidas en placas de 60 mm de diámetro y se incubaron durante 1 h a 37° en estufa de CO₂, con agitación cada 15 min. Se retiró el inóculo y se cubrieron las monocapas con 3 ml de medio semisólido conteniendo 1 volumen de MEM-D 2 x, 1 volumen de agar noble al 2% (Difco), suero fetal bovino al 1% final, HEPES 25 mM y gentamicina 50 µg/ml (Augé de Mello, P., 1976). Las placas se incubaron a 37°C en estufa gaseada durante 24-48 h hasta que se desarrollaran placas virales de un tamaño adecuado. Las células se fijaron con formol al 10% en agua durante 5 minutos, se retiró la capa de agar bajo chorro de agua y luego se tiñeron las monocapas con cristal violeta al 1% en agua destilada durante 5-10 min. Finalmente, se lavaron con

abundante agua, se contaron las placas virales formadas y se calculó el porcentaje de placas respecto del control. Para ello, en cada ensayo se incluyeron controles de VFA sin neutralizar que sirvieron para determinar el 100% de ufp en cada ensayo y a partir de este valor, se calcularon los porcentajes de placas obtenidas para cada dilución de suero.

Los títulos de neutralización se calcularon como el \log_{10} de la inversa de la dilución de suero o anticuerpo monoclonal que reducen el número de placas al 50%.

Todos los ensayos se realizaron por duplicado.

Pruebas de desafío viral

Los ratones inmunizados con las diferentes vacunas recombinantes y los animales control se desafiaron intraperitonealmente con 10^4 dosis letales 50% para ratón lactante (DLRL). Dos días después se extrajo sangre del plexo retroocular y se recogió en tubos con heparina. Se diluyó la sangre 1:10 en medio de cultivo MEM-Eagle y se inocularon ratones lactantes con 100 μ l de dicha dilución (con la sangre de cada ratón inmunizado se inocularon 6 ratones lactantes). Se realizaron inspecciones diarias para comprobar la presencia de ratones lactantes muertos durante 7 días. Se tomó como criterio de protección la ausencia de muertes por cada caja de 6 ratones lactantes.

V. Resultados

Para cumplir con los objetivos mencionados se escogieron como inmunógenos el sitio antigénico A, que comprende los aminoácidos 138 a 156 de la proteína estructural VP1 del serotipo C3, para ser expresado como parte de partículas semejantes a virus y la poliproteína P1, un polipéptido no procesado que contiene las 4 proteínas estructurales del VFA.

El sitio A es el sitio antigénico inmunodominante y está comprendido en el *loop* G-H de VP1 expuesto en la superficie del virión. Existen numerosas experiencias usando distintos modelos animales que muestran que es posible inducir una respuesta inmune mediante el empleo de vacunas basadas en péptidos sintéticos que imitan este sitio. Sin embargo, esta clase de vacunas mostró, en la mayoría de los casos, una inmunogenicidad marcadamente menor a la desarrollada por el uso de vacunas convencionales basadas en partículas virales enteras. La inmunogenicidad del péptido 140-160 derivado de la proteína VP1 del serotipo O fue drásticamente aumentada cuando se lo expresó como parte de una proteína de fusión al polipéptido *core* del VHB en el sistema vaccinia (Clarke *et al.*, 1987).

Por otro lado, el polipéptido precursor P1 resulta un antígeno interesante desde el punto de vista que presenta todos los epitopes lineales presentes en la partícula viral. Además, existen antecedentes en los que se muestra que esta proteína derivada de VFA serotipo C1 expresada en el sistema baculovirus presenta epitopes discontinuos reconocidos por anticuerpos monoclonales específicos obtenidos con partículas virales enteras (Saiz *et al.*, 1994).

Como parte de este trabajo de tesis, en una primera etapa se diseñaron estrategias para la expresión en *E. coli* y en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* de la proteína *core* del VHB, sola o fusionada al sitio antigénico A, y de la proteína precursora P1. Los resultados obtenidos mostraron que no fue posible expresar ni la proteína *core* ni la fusión *core*-A en *E. coli*, probablemente debido a su toxicidad. En levaduras, sólo se expresó a niveles detectables la proteína *core*, y no fue posible expresar ningún antígeno derivado del VFA (resultados no mostrados).

Respecto de la poliproteína P1, fue posible expresarla en *E. coli* como fusión a un corto péptido de histidinas para facilitar su purificación. Sin embargo, la proteína fue insoluble y sólo pudo extraerse mediante el empleo de *buffers* desnaturalizantes, perdiendo la posibilidad de ensayar la presencia de epitopes discontinuos. Además, debido a que *E. coli* no realiza modificaciones post-traduccionales tales como la

miristilación, y como esta modificación puede estar relacionada con el correcto plegamiento obtenido por Saiz y colaboradores (1994), esta versión bacteriana de P1 fue descartada.

Por lo tanto, se ensayó la expresión de las proteínas de interés en el sistema “baculovirus-células de insecto”, y el análisis de la expresión de los antígenos escogidos en este sistema consistió en la evaluación de tres parámetros:

- a) la factibilidad de expresión (que involucra toxicidad de los productos proteicos, niveles de expresión, degradación, conformación y solubilidad)
- b) la correcta localización celular y viral
- c) las propiedades antigénicas e inmunogénicas de los productos de expresión.

Para el clonado de los genes de las diferentes proteínas se empleó el plásmido de transferencia pVL1393, que contiene el locus completo del gen de la proteína poliedrina incluyendo regiones flanqueantes del virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica* clonados en el plásmido pUC8, pero carece de parte de la región codificante del gen poliedrina. Las secuencias *core*, *core-A* y las diferentes versiones de la poliproteína P1 destinadas al clonado en este sistema se diseñaron de tal manera de poseer su propio codón de iniciación ATG y secuencias consenso para su correcta traducción en este sistema, como se detalla en la tabla 1.3.1.

Gen	Contexto AUG
pol (Matsuura y col, 1987)	C C U A U A A A U A U G C C G G
p10 (Kuzio y col. 1984)	U U U A C A A U C A U G U C A A
p 6.9 (Wilson y col. 1987)	A A U U U A A A C A U G G U U U
vp39 (Thiem y Miller, 1989)	G G C A A C A A U A U G G C G C
Consenso	A Y A U G Y
<i>core</i> (este trabajo)	A G A T C T A G C A U G G A C A
<i>core-A</i> (este trabajo)	U C U C C A C C A U G G C C U
P1 Mir (este trabajo)	G G A T C C A A U A U G G G A G
P1Mir-2A (este trabajo)	G G A T C C A A U A U G G G A G

Tabla 1.3.1. Secuencias que enmarcan el codón de iniciación de diferentes proteínas expresadas en baculovirus. Se resalta la presencia de adenina en la posición -3 y purinas en las posiciones -1 y +2.

1. Construcción del plásmido de transferencia pVLP1Mir

Con el objeto de aislar la información genética codificante para la poliproteína precursora P1, se amplificó la región comprendida entre VP4 (1A) y VP1 (1D) mediante PCR con los oligonucleótidos P1Mir y P1Neg a partir de ADNc como se esquematiza en la figura 1.1.

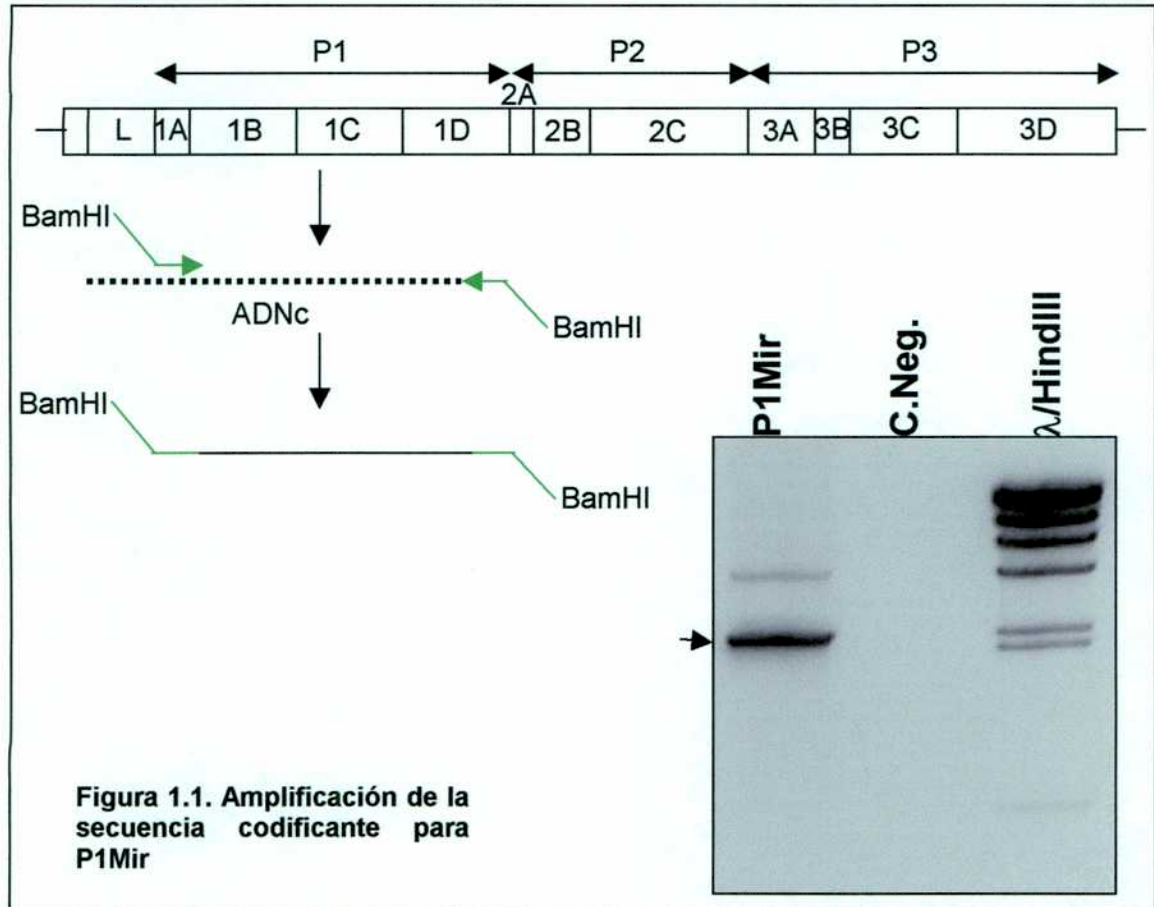


Figura 1.1. Amplificación de la secuencia codificante para la poliproteína precursora P1Mir. Mediante PCR con los oligonucleótidos P1Mir y P1Neg se amplificó un fragmento de ADN de 2196 pb. Su tamaño se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. C.Neg.: control negativo de la reacción de PCR. λ /HindIII: ADN del fago λ digerido con la enzima HindIII y usado como marcador de peso molecular.

El oligonucleótido de polaridad positiva P1Mir incluye un codón de iniciación ATG seguido de un triplete GGA codificante para el aminoácido glicina, permitiendo de esta manera una correcta miristilación de la proteína P1. El fragmento amplificado y digerido con la enzima BamHI se ligó molecularmente al plásmido pVL1393 digerido con la misma enzima para originar el plásmido pVLP1Mir, cuyas secuencias de interés se representan en la figura 1.2.

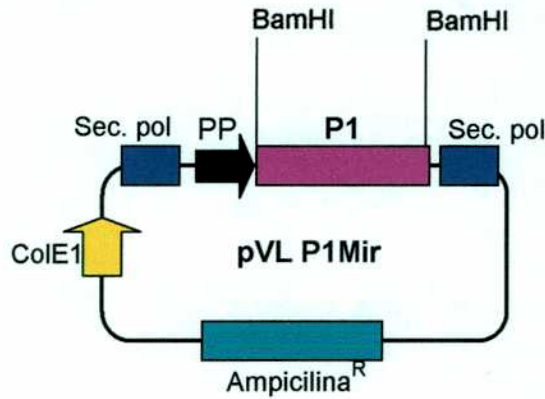


Figura 1.2. Plásmido de transferencia para baculovirus pVLP1Mir. La secuencia codificante para la poliproteína P1 se clonó bajo la regulación del promotor de poliedrina (PP). Flanqueando el promotor y el gen de interés existen secuencias del *locus* poliedrina para permitir la recombinación homóloga con el genoma de baculovirus (Sec.pol).

Para confirmar la integridad y orientación de la secuencia P1, se digirieron los plásmidos recombinantes preparados a partir de las bacterias transformadas y se seleccionaron aquellos clones que por digestión con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI desprendieron bandas de aproximadamente 2200 y 2100 pb respectivamente. La digestión de plásmidos con el inserto en la orientación incorrecta con la enzima EcoRI desprende una banda de 300 pb aproximadamente. La estrategia de selección se detalla en la figura 1.3.

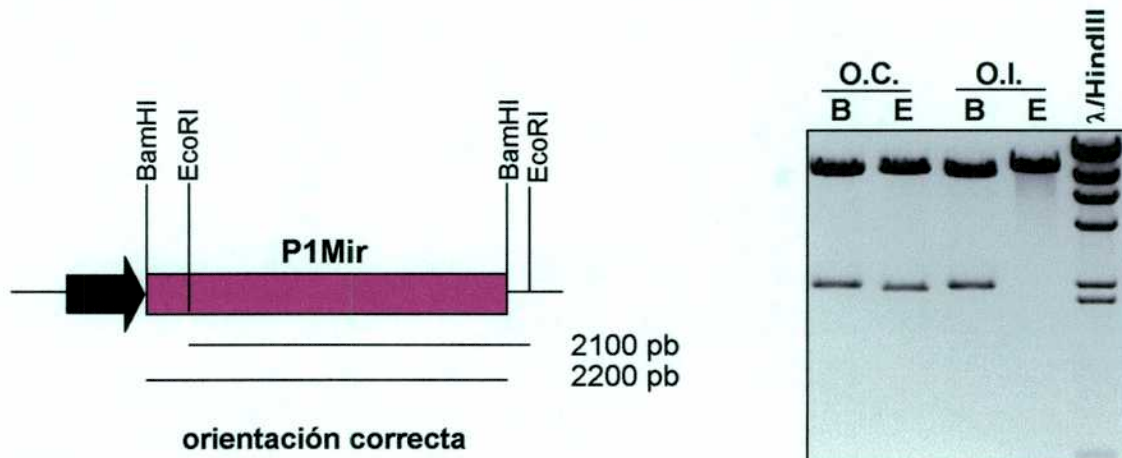


Figura 1.3. Selección de los clones transformados con el plásmido recombinante pVLP1Mir en la orientación correcta. Se digirió ADN extraído de cada clon con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se analizaron los productos de digestión mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. OC: orientación correcta, OI: orientación invertida, λ/HindIII: ADN del fago λ digerido con la enzima HindIII y usado como marcador de peso molecular.

2. Construcción del plásmido de transferencia pVLP1Mir-2A

Con el objeto de clonar el ADN codificante para la poliproteína precursora P1 unida a la secuencia codificante para el polipéptido 2A, se amplificó mediante PCR con los oligonucleótidos P1Mir y P1-2A a partir de ADNc la región comprendida entre VP4 (1A) y 2A como se esquematiza en la figura 2.1.

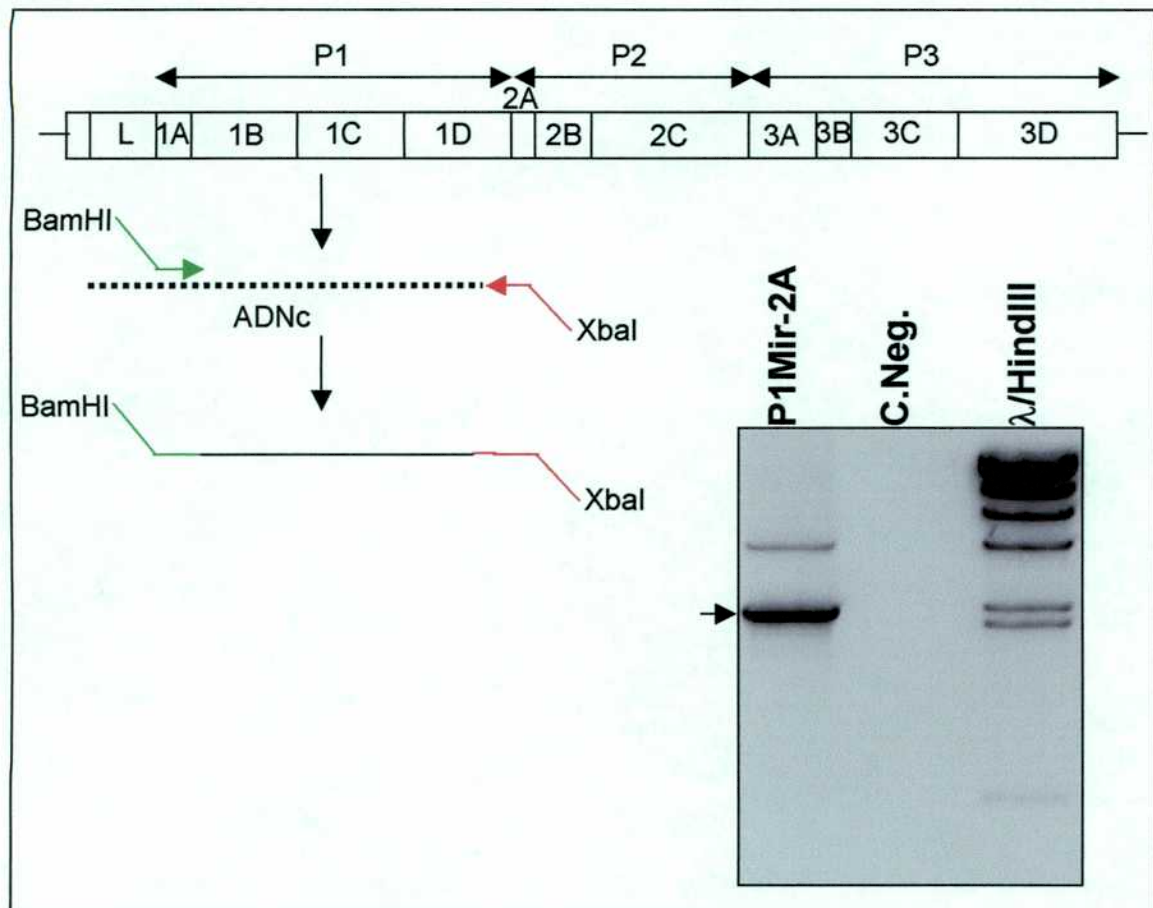


Figura 2.1. Amplificación de la secuencia codificante para P1Mir-2A. Mediante PCR con los oligonucleótidos P1Mir y P1-2A se amplificó un fragmento de ADN de 2246 pb. Su tamaño se confirmó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio. C.Neg: control negativo de la reacción de PCR. λ /HindIII: ADN del fago λ digerido con la enzima HindIII y usado como marcador de peso molecular.

Como se mencionó anteriormente, el oligonucleótido de polaridad positiva P1Mir incluye un codón de iniciación ATG seguido de un triplete GGA codificante para el aminoácido glicina, permitiendo de esta manera una correcta miristilación de la proteína P1-2A. El oligonucleótido de polaridad negativa P1-2A es complementario a las últimas 21 bases del polipéptido 2A e incluye la secuencia complementaria a un codón de terminación y un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción XbaI. El fragmento amplificado y digerido con las enzimas BamHI y XbaI se ligó

molecularmente al plásmido pVL1393 digerido con las mismas enzimas para originar el plásmido pVLP1Mir-2A, cuyas secuencias se esquematizan en la figura 2.2.

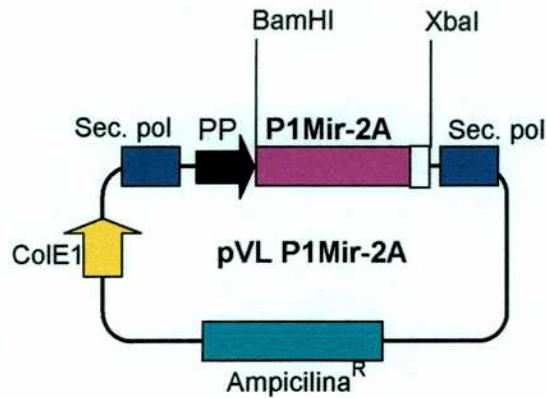


Figura 2.2. Plásmido de transferencia para baculovirus pVLP1Mir-2A. La secuencia codificante para la poliproteína P1unida al polipéptido 2A se clonó bajo la regulación del promotor de poliedrina (PP). Rodeando al promotor y al gen de interés existen secuencias del locus poliedrina (Sec.pol) para permitir la recombinación homóloga con el genoma de baculovirus.

Dada la naturaleza dirigida del clonado, se verificó la presencia del inserto en los plásmidos recuperados de bacterias transformadas mediante digestión simultánea con las enzimas BamHI y XbaI, seleccionando aquellos clones que desprendieron una banda de aproximadamente 2240 pb. La estrategia de selección se detalla en la figura 2.3.

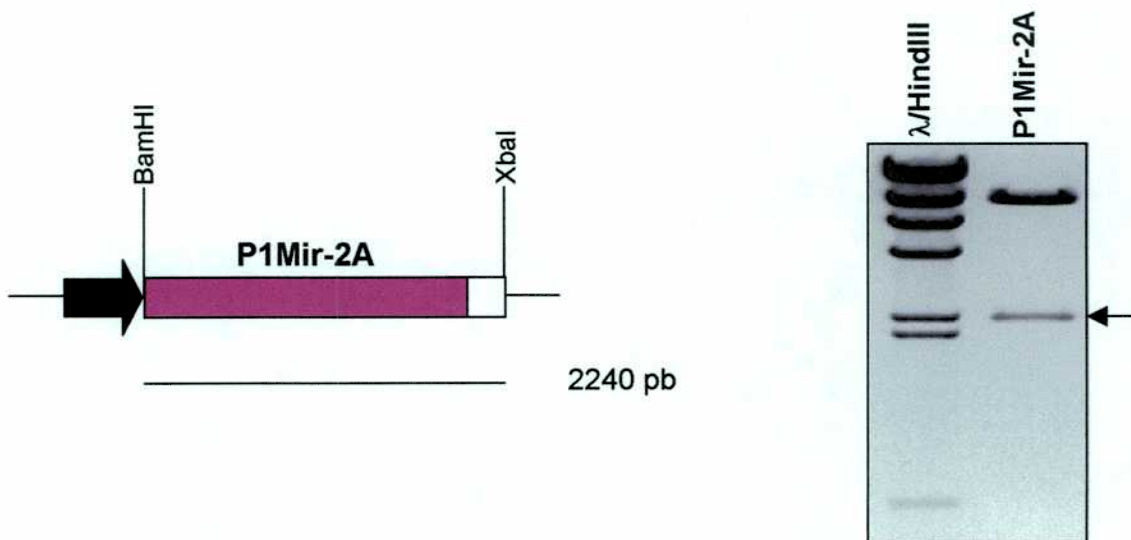


Figura 2.3. Confirmación de la presencia de la secuencia P1Mir-2A en el vector pVLP1Mir-2A. Se digirió ADN plasmídico con las enzimas de restricción BamHI y XbaI, y se analizó la presencia de una banda de 2240 pb en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio. λ /HindIII: ADN del fago λ digerido con la enzima HindIII y usado como marcador de peso molecular.

3. Construcción del plásmido de transferencia pVL_{core}

La secuencia codificante para la proteína *core* obtenida como se detalla en **Materiales y Métodos** se ligó molecularmente al plásmido pVL1393 para originar el plásmido pVL_{core}. La estrategia de clonado se representa en la figura 3.1.

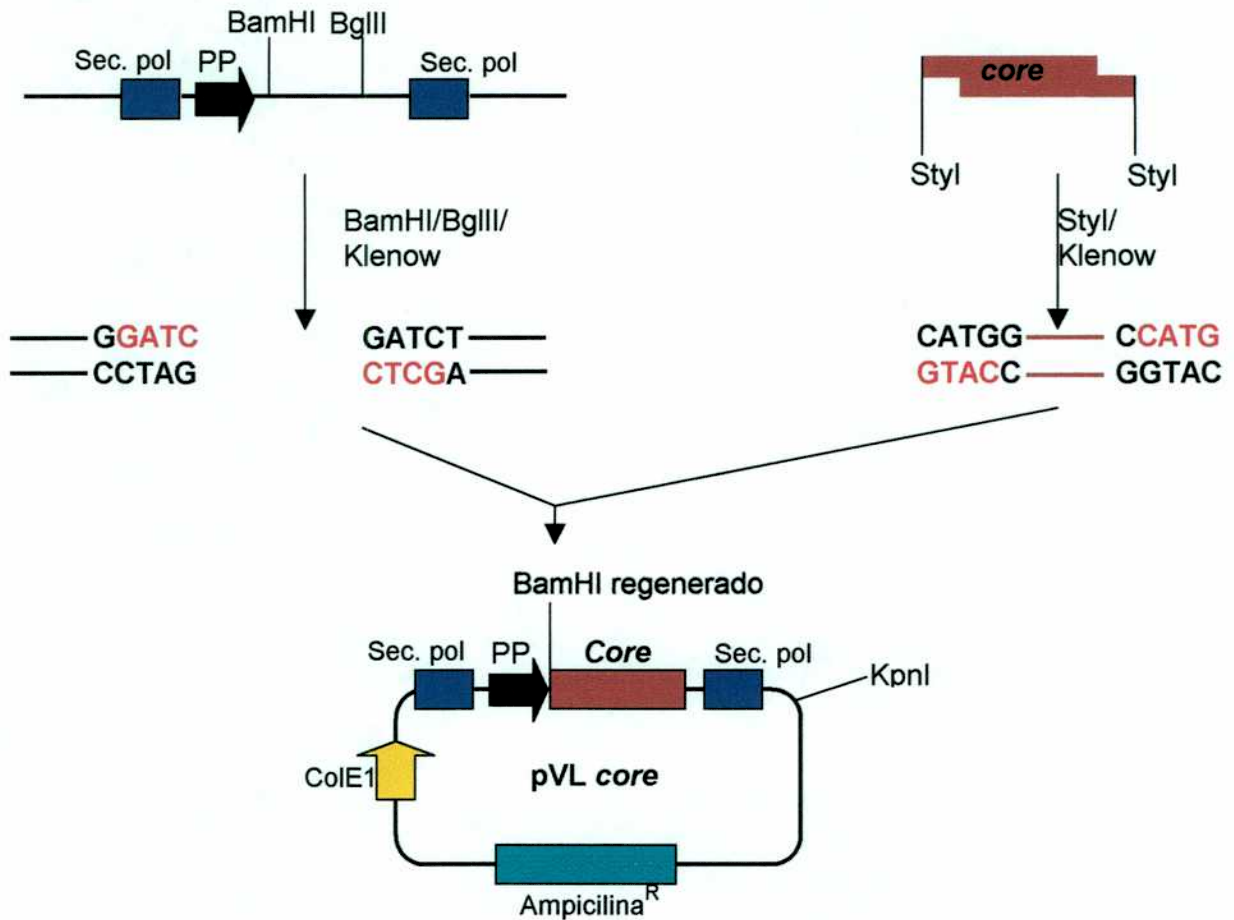


Figura 3.1. Construcción del plásmido de transferencia pVL_{core}. La secuencia *core* se aisló a partir del plásmido pETHBV que contiene parte del genoma del virus de la hepatitis B por digestión con la enzima StyI y posterior rellenado de sus extremos con el fragmento Klenow. Este fragmento se clonó entre los sitios BamHI y BglIII del plásmido pVL1393 luego de tratamiento con el fragmento Klenow. De esta manera, se regenera el sitio BamHI río arriba de la secuencia *core*.

De las bacterias transformadas se seleccionaron los clones con inserto por digestión con las enzimas BamHI y KpnI y se determinaron aquellos con la orientación correcta mediante secuenciación de ácidos nucleicos .

Las secuencias relevantes de este plásmido se representan en la figura 3.2.

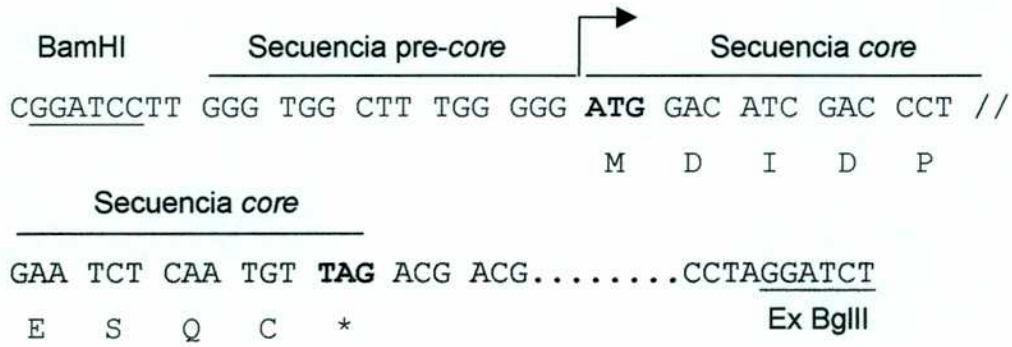


Figura 3.2. Secuencias relevantes del plásmido pVLcore. La secuencia codificante para la proteína core está precedida por un corto trecho de la secuencia pre-core. La traducción debe comenzar en el codón de iniciación ATG marcado en negra.

4. Construcción del plásmido de transferencia pVLcoreA

El dúplex de ADN codificante para el sitio antigénico A generado por hibridación de los oligonucleótidos A138 y A156 como se describe en Materiales y Métodos se digirió con la enzima de restricción BgIII y se ligó molecularmente al plásmido pVLcore digerido por la enzima BamHI (ambas enzimas poseen extremos protroyentes compatibles). La estrategia de clonado se detalla en la figura 4.1.

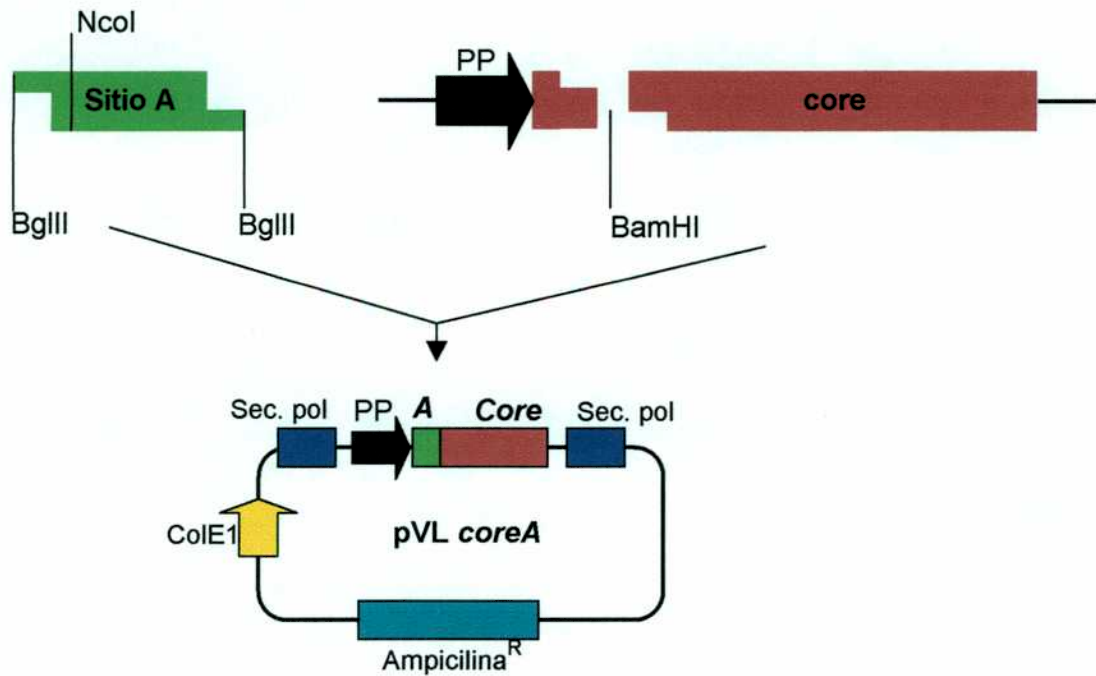


Figura 4.1. Construcción del plásmido de transferencia pVLcoreA. La secuencia del sitio A se clonó rí arriba y manteniendo un marco de lectura continuo con la secuencia core.

Para confirmar la presencia y orientación de la secuencia del sitio A, se digirieron los plásmidos recombinantes preparados a partir de las bacterias transformadas y se seleccionaron aquellos clones que por digestión con las enzimas de restricción NcoI (presente en el sitio A) y KpnI (presente en el vector) desprendieron una banda de aproximadamente 1075 pb. Si el inserto se encontraba en la orientación inversa, el producto de la misma digestión produciría una banda de aproximadamente 1000 pb. La estrategia de selección se detalla en la figura 4.2.

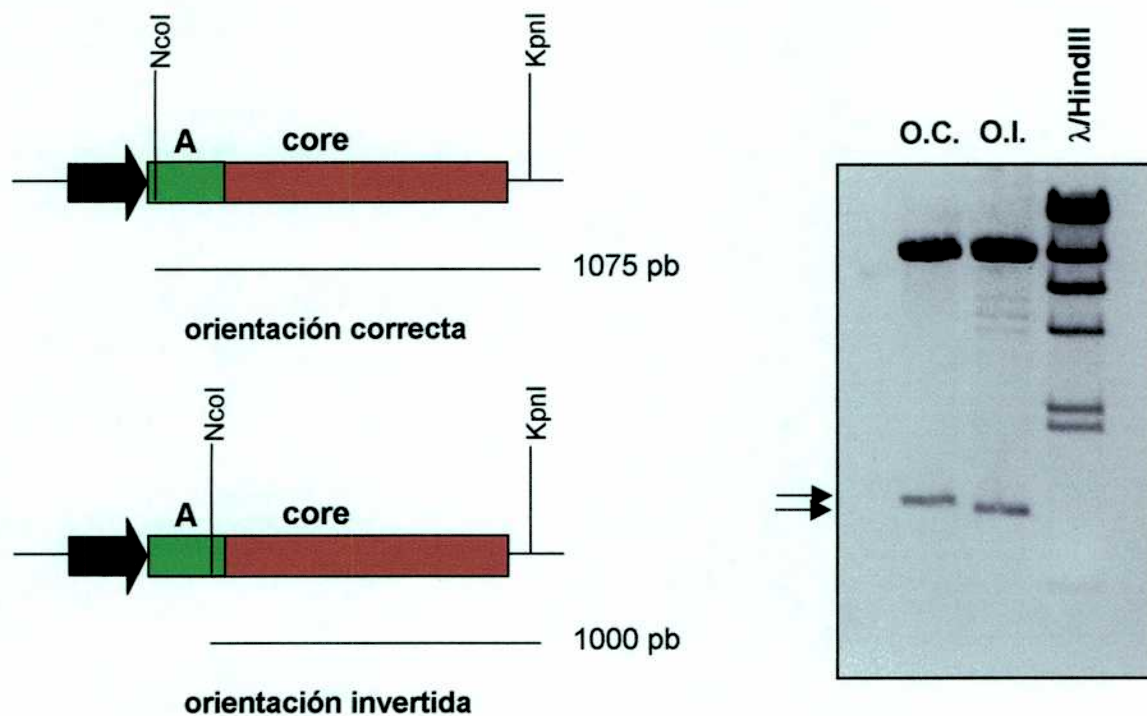


Figura 4.2. Confirmación de la orientación de la secuencia del sitio A en el vector pVLcoreA. Se seleccionaron aquellos clones que por digestión con las enzimas NcoI y KpnI desprendieron una banda de 1075 pb (orientación correcta, O.C.) de aquellos que desprendieron una banda de 1000 pb (orientación invertida, O.I.).

Las secuencias relevantes del plásmido pVLcoreA se muestran en la figura 4.3.

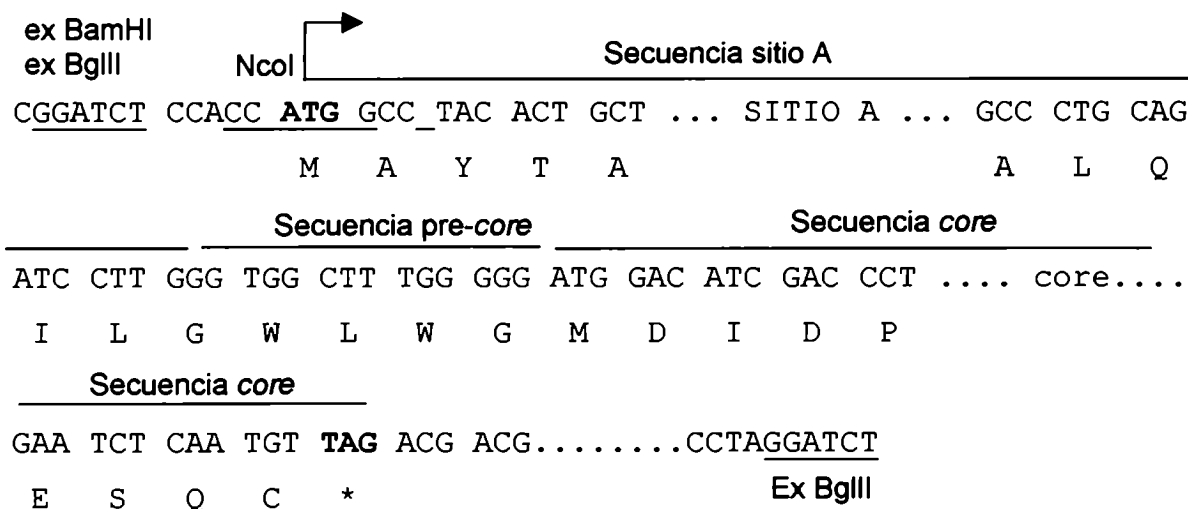


Figura 4.3. Secuencias relevantes del plásmido pVLcoreA. La secuencia codificante para la proteína core está precedida por un corto trecho de la secuencia pre-core. La traducción debe comenzar en el codón de iniciación ATG marcado en negrita.

5. Obtención de los baculovirus recombinantes

Los plásmidos recombinantes derivados del vector pVL1393 son compatibles con el *kit* de transfección BaculoGold, de manera que la cotransfección de estos plásmidos con el ADN de BaculoGold rescata por recombinación homóloga una delección letal presente en el ADN viral, rindiendo más del 99% de virus recombinantes. Luego de la cotransfección se cosechó el sobrenadante y se realizaron dos rondas de purificación de clones por dilución a punto final. Se seleccionaron entonces cuatro clones para cada baculovirus. Se denominaron **AcNPVC** a los baculovirus recombinantes para la proteína core, **AcNPVCA** a los baculovirus recombinantes para la proteína de fusión core-sitio A, **AcNPVP1** a los baculovirus recombinantes para la proteína P1 y **AcNPVP12A** a los baculovirus recombinantes para la proteína P1-2A. Con el propósito de aumentar el título viral, se realizaron dos amplificaciones sucesivas. De cada *stock* viral obtenido se calculó el título mediante ensayos de titulación en placas. Los títulos promedio obtenidos fueron de 10^8 ufp/ml aproximadamente.

Cada uno de los *stocks* de trabajo se mantuvo refrigerado a 4°C hasta su uso.

6. Expresión de las proteínas recombinantes *core* y *core-A*

Con diferentes clones virales se infectaron monocapas de células Sf9 y luego de 5 días se extrajeron las proteínas totales mediante extracción con el *buffer* de lisis NP40. Se analizaron las proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 15% y se determinó la presencia de proteínas recombinantes mediante tinción con el colorante azul de Coomassie y *Western blot* con anticuerpos anti-*core* o anti-sitio A. Los resultados se muestran en las figuras 6.1. y 6.2.

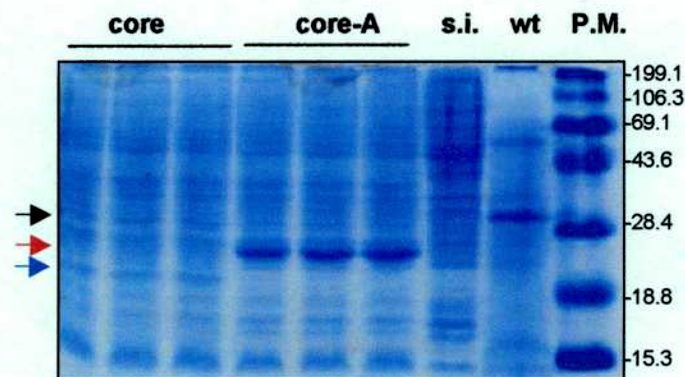


Figura 6.1. Tinción con azul de Coomassie de las proteínas recombinantes. Los extractos de células infectadas con los baculovirus recombinantes se analizaron en geles de poliacrilamida luego de 5 días de infección. Como controles se usaron células sin infectar y células infectadas con el baculovirus salvaje AcNPV. Panel A: células infectadas con 3 clones diferentes del baculovirus AcNPVC (calles 1, 2 y 3), con 3 clones diferentes del baculovirus AcNPVCA (calles 4, 5 y 6), células sin infectar (calle 7) y células infectadas con el baculovirus salvaje AcNPV. Se indican los tamaños de los marcadores de peso molecular (PM) en kDa y con flechas se señalan las posiciones de las proteínas de interés (azul: *core*, rojo: *core-sitio A* y negro: poliedrina).

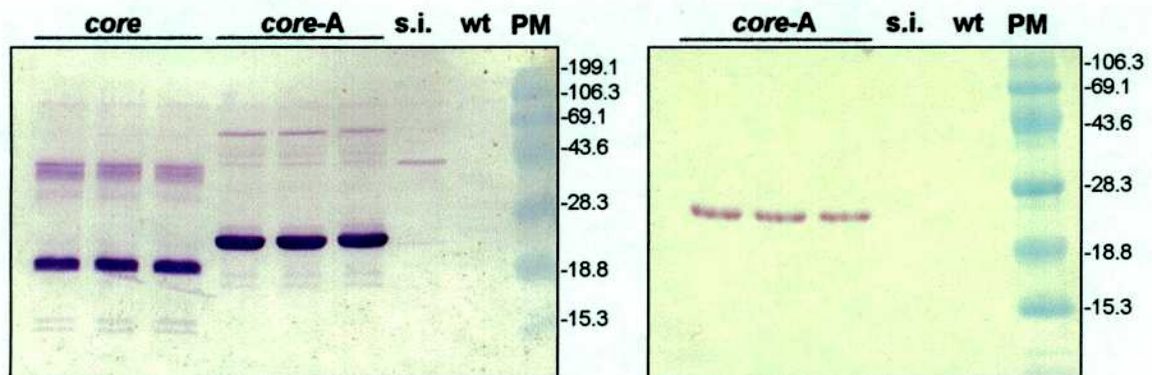


Figura 6.2. Western blot de las proteínas recombinantes. Se analizaron mediante electroforesis los extractos celulares infectados con los baculovirus recombinantes AcNPVC y AcNPVCA (paneles A y B) y se revelaron las proteínas recombinantes mediante *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti *core* (panel derecho) o anticuerpos monoclonales anti sitio A (panel izquierdo). Como controles se usaron extractos de células infectadas con baculovirus salvajes (*wt*) y células sin infectar (*si*). Los tamaños de los marcadores de peso molecular se indican en kDa.

De las figuras se desprende que fue posible expresar en el sistema "baculovirus-células de insecto" la proteínas *core* y *core-A*. Estas proteínas pudieron extraerse exitosamente con el *buffer* NP40 y tuvieron el peso molecular esperado (21,3 kDa para la proteína *core* y 24,4 kDa para la proteína *core-A*). Los niveles de proteína recombinante obtenidos por el método empleado fueron del orden de 5% para la proteína *core* y 15% para la proteína *core-A* respecto de las proteínas totales.

La identidad de las proteínas *core* y *core-A* fue confirmada por los experimentos de *Western blot*. Ambas proteínas recombinantes reaccionaron con anticuerpos específicos anti *core* y la proteína *core-A* reaccionó también con un *pool* de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio antigénico A del VFA de serotipo C3, revelando de esta manera su naturaleza quimérica. La ausencia de bandas a la altura de la proteína *core* en los extractos de células infectadas con el baculovirus AcNPVCA indica que el inicio de la traducción ocurre mayoritariamente en el codón AUG del sitio A del VFA, inmediato al promotor de poliedrina.

7. Evaluación de la cinética de expresión de las proteínas recombinantes *core* y *core-A*

Para evaluar el tiempo óptimo de cosecha de las proteínas recombinantes *core* y *core-A*, se infectaron monocapas de células Sf9 con los baculovirus recombinantes AcNPVC y AcNPVCA respectivamente y se extrajeron las proteínas con el *buffer* de extracción NP40 a diferentes días post infección. Con cada muestra se realizaron ensayos de *Western blot* con anticuerpos anti-*core* o anti-sitio A. Los resultados se muestran en la figura 7.3.



Figura 7.3. Western blot de las proteínas recombinantes *core* y *core-A* extraídas a diferentes días post infección. Se resolvieron mediante electroforesis los extractos celulares infectados con los baculovirus recombinantes AcNPVC y AcNPVCA extraídos a diferentes días post infección (días

1 a 6) y se revelaron las proteínas recombinantes mediante *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti *core*. Como controles se usaron extractos de células infectadas con baculovirus salvajes (wt). Los tamaños de los marcadores de peso molecular se indican en kDa. Se indican con flechas las posiciones de las proteínas recombinantes *core* (azul) y *core-A* (rojo).

Ambas proteínas pudieron detectarse a las 24 h. post infección, y comenzaron a acumularse en el citoplasma de las células de insecto infectadas hasta alcanzar un *plateau* a los 5 días. A partir del día 6, la lisis celular comenzó a ser pronunciada y las proteínas recombinantes se liberaron al medio de cultivo, mostrando que el tiempo óptimo de cosecha para ambas proteínas fue 5 días post infección.

Además de los productos recombinantes del peso molecular esperado, en los extractos celulares infectados con el baculovirus recombinante AcNPVC se detectó con anticuerpos anti-*core* una banda de aproximadamente 18 kDa que representa muy probablemente un producto de clivaje de la proteína *core*. Si este clivaje ocurre también en la proteína quimérica *core-A*, debe tener lugar en la porción carboxilo terminal de la molécula *core*, pues no se observó en los extractos de células infectadas con el baculovirus recombinante AcNPVCA cuando éstos fueron revelados con anticuerpos anti-sitio A (ver Figura 6.2).

8. Expresión de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A

Con diferentes clones de los baculovirus AcNPVP1 y AcNPVP1-2A se infectaron células Sf9 y a los 5 días post infección se extrajeron con *buffer* Np40 las proteínas totales. Las proteínas se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% y se analizó la presencia de proteínas recombinantes mediante tinción con azul de Coomassie y *Western blot* con anticuerpos anti sitio A. Los resultados se muestran en las figuras 8.1 A y B.

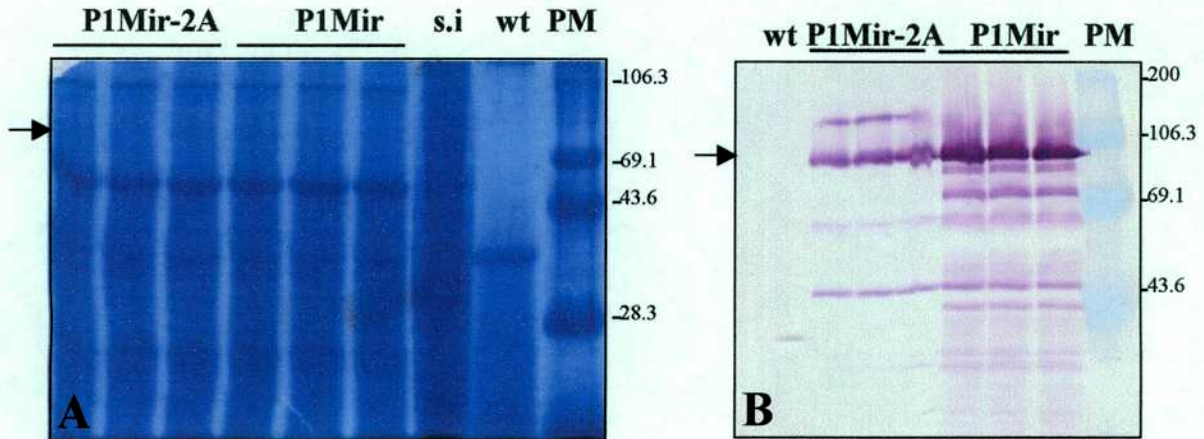


Figura 8.1. Expresión de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A. Las proteínas de extractos de células infectadas con 3 clones diferentes de cada baculovirus recombinante se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% y se tiñó el gel con el colorante azul de Coomassie (panel A) o se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa y se revelaron las proteínas recombinantes por *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A (panel B). Los tamaños de los marcadores de peso molecular se indican en kDa. Se indican con flechas las posiciones esperadas para las proteínas recombinantes. Como controles se usaron extractos de células infectadas con baculovirus salvajes (wt) y de células sin infectar (si). Los tamaños de los marcadores de peso molecular se indican en kDa. Se indican con flechas las posiciones de las proteínas recombinantes.

De las figuras anteriores se desprende que se expresaron con éxito las proteínas P1Mir y P1Mir-2A en el sistema de expresión "baculovirus-células de insecto". Estas proteínas pudieron extraerse con el *buffer* NP40 y mostraron el peso molecular esperado (aproximadamente 80 kDa para P1 y 81,3 para P1-2A). Los niveles de expresión de la proteína P1Mir fueron bajos, no pudiéndose individualizar la banda correspondiente en geles teñidos con el colorante azul de Coomassie. Los niveles de expresión obtenidos para la proteína P1Mir-2A fueron aún menores, a juzgar por la intensidad de las bandas observadas en el experimento de *Western blot* comparadas a la intensidad de P1Mir.

Ambas proteínas recombinantes reaccionaron con anticuerpos monoclonales anti sitio A en los experimentos de *Western blot*, confirmando su identidad. Estos experimentos revelaron también la existencia de bandas de menor peso molecular, probablemente productos de degradación a partir del extremo amino terminal, ya que el sitio A se encuentra situado en la proteína VP1, en el extremo carboxilo terminal de ambas proteínas precursoras.

9. Evaluación de la cinética de expresión de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A

Para evaluar el tiempo óptimo de cosecha de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A, se infectaron monocapas de células Sf9 con los baculovirus recombinantes AcNPVP1 y AcNPVP1-2A respectivamente y se extrajeron las proteínas con el *buffer* de extracción NP40 a diferentes días post infección. Con cada muestra se realizaron ensayos de *Western blot* con anticuerpos anti-sitio A. Los resultados se muestran en la figura 9.

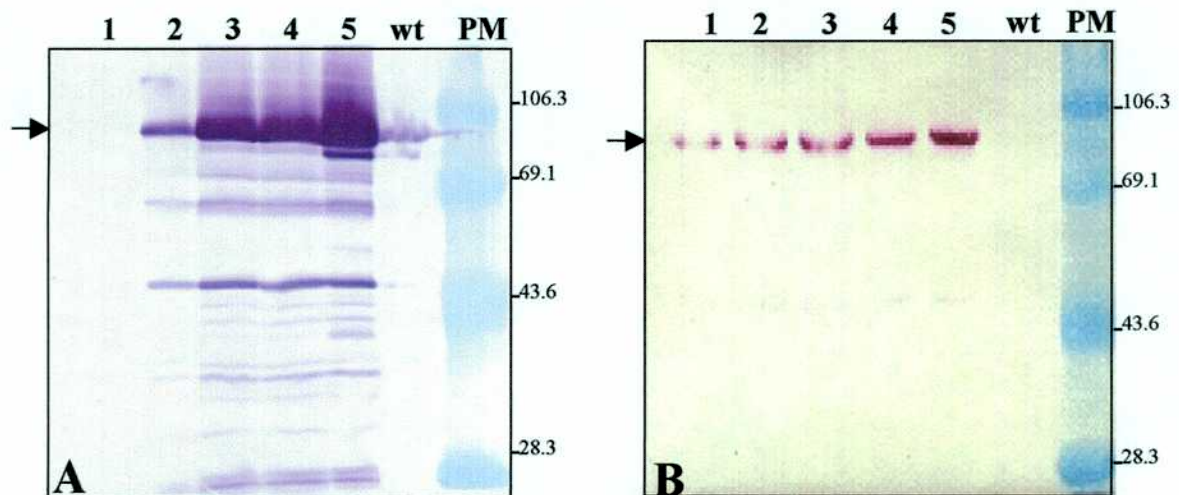


Figura 9. Western blot de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A extraídas a diferentes días post infección. Se resolvieron mediante electroforesis los extractos celulares infectados con los baculovirus recombinantes AcNPVP1 (panel A) y AcNPVP1-2A (panel B) extraídos a diferentes días post infección y se revelaron las proteínas recombinantes mediante *Western blot* con un anticuerpo policlonal anti sitio A. Como controles se usaron extractos de células infectadas con baculovirus salvajes (wt). Los tamaños de los marcadores de peso molecular se indican en kDa. Se indican con flechas las posiciones de las proteínas recombinantes.

Ambas proteínas se detectaron en el citoplasma de células infectadas a los 2 días post infección y siguieron acumulándose hasta los 5 días post infección. Sin embargo, la proteína P1Mir mostró abundantes productos de degradación a partir del día 3, por lo que se determinó como tiempo óptimo de cosecha los 3 días post infección. La proteína P1Mir-2A continuó acumulándose en el citoplasma de células de insecto hasta los 5 días post infección, no observándose productos de degradación.

10. Evaluación de la particulación de las proteínas recombinantes *core* y *core-A*

Debido a que las propiedades inmunogénicas de las fusiones con la proteína *core* son fuertemente dependientes de su capacidad de particulación (Francis *et al.*, 1987), se evaluó su grado de multimerización mediante sedimentación en gradientes de sacarosa. Para ello se infectaron monocapas de células Sf9 con los baculovirus recombinantes AcNPVC y AcNPVCA y 5 días post infección se extrajeron las proteínas con *buffer* de lisis NP40. Los extractos clarificados se ultracentrifugaron sobre gradientes de sacarosa 15-40% y se colectaron 16 fracciones. Se cuantificó la cantidad de proteína total de cada fracción mediante el método de Biuret y se evaluó la presencia de las proteínas recombinantes en cada fracción por *Western blot* con anticuerpos anti *core*, cuantificando mediante densitometría la intensidad de cada banda específica como pixeles. Los resultados se muestran en la figura 10.1.

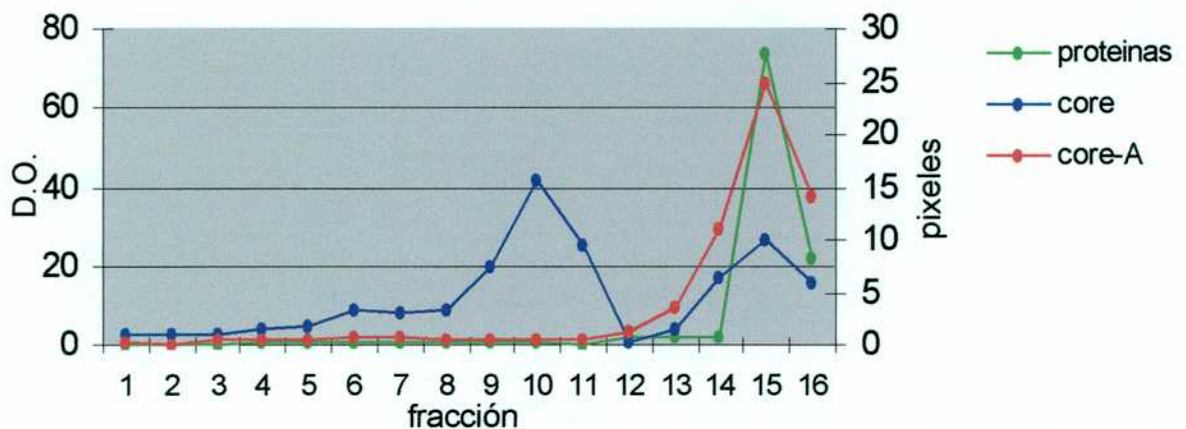


Figura 10.1. Particulación de las proteínas *core* y *core-A*. El gráfico representa el valor de las proteínas totales en cada fracción mediante la D.O. obtenida por el método de Biuret (indicada en la referencia como "proteínas") y la cantidad de proteína recombinante medida como pixeles correspondientes a cada banda analizada por *Western blot*.

Como puede observarse en el gráfico, no fue posible obtener la proteína de fusión *core-A* de manera particulada, ya que se observa que la totalidad de su señal se acumula en la parte superior del gradiente. Por el contrario, la proteína *core* muestra un mayor coeficiente de sedimentación, separándose de las proteínas totales y atravesando el gradiente hasta la fracción 10 debido a su naturaleza particulada. Esto podría deberse a que el agregado de la secuencia foránea sitio A

cambiaría la conformación espacial impidiendo su agregación o podría dar lugar a partículas inestables, que se disgregarían rápidamente.

En base a estos resultados, y con el objeto de aumentar la estabilidad de los multímeros que exponen el sitio A, se decidió intentar la particulación de la proteína de fusión *core-A* mediante coinfección de células Sf9 con los baculovirus AcNPVC y AcNPVCA. Esto permitiría asociarse a las moléculas *core-A* con moléculas *core* dando lugar a moléculas híbridas *core-core-A*. Se estudiaron diferentes proporciones de los dos baculovirus AcNPVC:AcNPVCA (1:3, 1:1 y 3:1) en experimentos de coinfecciones. La cantidad de proteína total y la presencia de las proteínas recombinantes en cada fracción fueron cuantificadas mediante densitometría como se describió anteriormente. La proporción que permitió obtener mayor cantidad de moléculas *core-A* en las partículas híbridas fue la de AcNPVC:AcNPVCA 3:1, como se muestran en la figura 10.2.

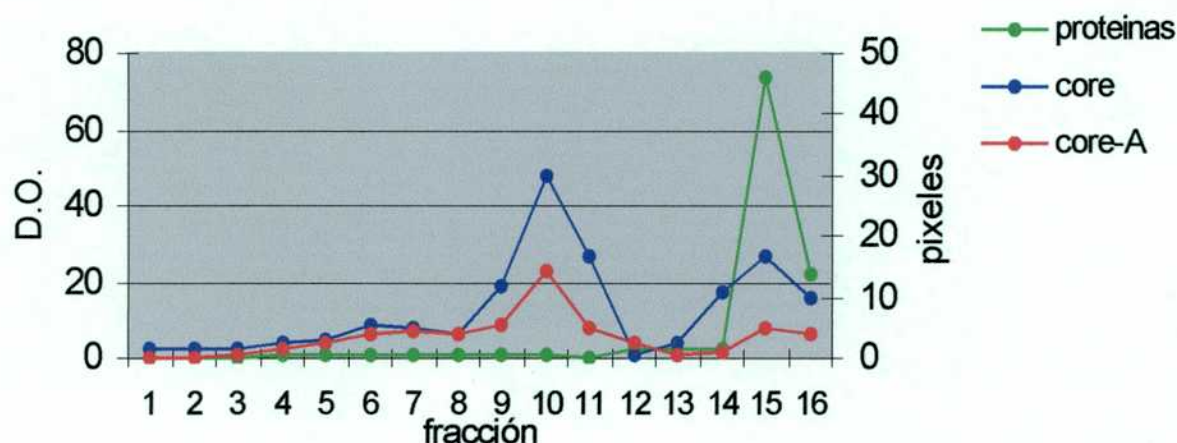


Figura 10.2. Particulación de las proteínas *core* y *core-A* en experimentos de coinfección. El gráfico representa el valor de las proteínas totales en cada fracción mediante la D.O. obtenida por el método de Biuret (indicada en la referencia como "proteínas") y la cantidad de proteína recombinante medida como pixeles correspondientes a cada banda analizada por *Western blot*.

Como se observa en la figura anterior, se formaron partículas híbridas entre las proteínas *core* y *core-A*, mostrando un pico de sedimentación en las mismas fracciones en las que lo hiciera el homomultímero *core*. En las partículas híbridas, la proporción de *core-A:core* fue de aproximadamente 1:2, como pudo observarse midiendo la intensidad de cada banda resuelta mediante *Western blot*.

En las otras relaciones de coinfección con los baculovirus recombinantes para *core:core-A* (1:1 y 1:3) también se observó la formación de partículas híbridas, aunque la proporción de moléculas *core-A* respecto de moléculas *core* en éstas fue considerablemente menor (resultados no mostrados).

Con el objeto de probar que los epitopes derivados del VFA estuvieran expuestos en la superficie de las partículas mixtas *core-core-A*, se realizaron ensayos de ELISA en los que se capturaron sobre placas de ELISA las estructuras particuladas, purificadas de gradientes de sacarosa y dialisadas contra *buffer* PBS, mediante un anticuerpo de conejo anti *core* y se reveló la presencia de los epitopes heterólogos mediante un *pool* de anticuerpos monoclonales de ratón anti sitio A. Los resultados obtenidos se representan en la figura 10.3.

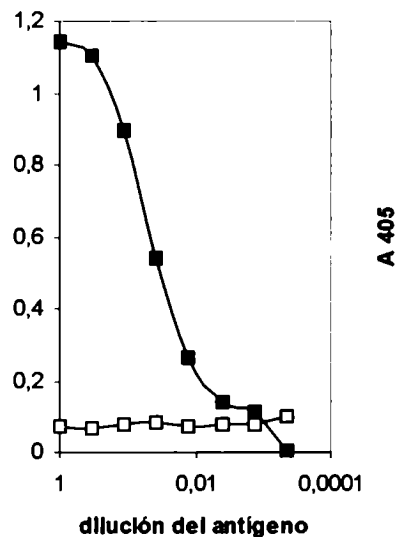


Figura 10.3. ELISA *sandwich* de las partículas mixtas *core/core-A*. Las partículas *core/core-A* (cuadrados negros) purificadas de gradientes de sacarosa fueron diluidas seriadamente en *buffer* PBS, atrapadas con un anticuerpo de conejo anti-*core* y se reveló su presencia con un *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A del VFA. Como control se usaron partículas *core* purificadas por gradiente de sacarosa (cuadrados blancos).

La reactividad del sitio antigénico A en los experimentos de ELISA *sandwich* demuestran que los anticuerpos monoclonales anti sitio A reconocen este sitio antigénico en la superficie de las partículas quiméricas. Como estos anticuerpos monoclonales se obtuvieron por inoculación de ratones con VFA entero, el sitio A es reconocido en la superficie de las partículas de manera similar a lo que lo es en el virión nativo.

11. Evaluación de la conformación adoptada por las proteínas precursoras P1Mir y P1Mir-2A

La poliproteína P1 resulta un inmunógeno de interés debido a que esta proteína precursora presenta en su secuencia aminoacídica todos los sitios antigénicos ubicados en cada una de las proteínas estructurales que forman parte del virión. Sin embargo, mediante clivajes proteolíticos se estableció que los principales sitios antigénicos secuenciales se encuentran ubicados sobre la proteína VP1, por lo que el interés principal en la poliproteína P1 no está constituido por los epitopes secuenciales sino por la capacidad de adoptar conformaciones espaciales que emulen sitios antigénicos discontinuos presentes en la partícula viral intacta (Saiz *et al.*, 1994).

Con el objeto de evaluar la presencia de estos sitios antigénicos discontinuos en las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A expresadas en el sistema "baculovirus-células de insecto" se realizaron experimentos de *dot blot* con extractos de células infectadas con los baculovirus AcNPVP1 y AcNPVP1-2A obtenidos por extracción con el *buffer* NP40. Como controles se usaron los mismos extractos desnaturalizados por calentamiento, extractos de células infectadas con baculovirus salvajes y VFA entero. Los resultados se resumen en la tabla 11.

ANTIGENO	ANTICUERPO MONOCLONAL								
	7JD1 (c)	4D7 (d)	1G5 (d)	3E9 (d)	2E5 (d)	5C4 (d)	7BH11(d)	2A12 (d)	3G5 (d)
VFA	■								
VFA inactivado									
P1Mir	■								
P1Mir inactivada									
P1Mir-2A	■					■			
P1Mir-2A inactivada									
baculovirus wt									

Tabla 11. Reactividad de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A con un panel de anticuerpos monoclonales conformacionales. La masa de los diferentes antígenos fue previamente estandarizada mediante reactividad con un anticuerpo monoclonal secuencial (7JD1). La reactividad está expresada como intensidad de color: fuerte (negro), débil (gris) o ausencia de señal (blanco). Cuando corresponde, los antígenos fueron inactivados por incubación de 2 min. en agua hirviendo antes de ser aplicados a la membrana de nitrocelulosa.

Los resultados de los ensayos de *dot blot* demostraron que tanto las proteínas P1Mir como P1Mir-2A fueron correctamente reconocidas por el anticuerpo monoclonal 7JD1. Debido a que este anticuerpo reconoce un epítopo secuencial en el sitio antigénico A, la desnaturalización tanto de las proteínas P1Mir y P1Mir-2A como del virus C3Arg85 no alteró su reactividad. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales conformacionales empleados en este experimento no reconocieron ambas proteínas recombinantes, con la excepción del anticuerpo 5C4, que mostró una reactividad débil con P1Mir y P1Mir-2A. Sin embargo, esta misma reactividad se encontró con el virus aftoso desnaturalizado, hecho probablemente debido a que este anticuerpo tiene una afinidad suficiente para uno de los segmentos del epítopo discontinuo como para reconocer este segmento aislado, aunque con afinidad inferior a la de la proteína nativa. Juntos, estos resultados indican que los epítopos secuenciales son correctamente reconocidos en las proteínas recombinantes, pero tanto P1Mir como P1Mir-2A no adoptan conformaciones espaciales compatibles con la formación algunos de los epítopos discontinuos presentes en los viriones intactos.

12. Inmunogenicidad de las proteínas expresadas en el sistema “baculovirus-células de insecto”

12.1. Inmunogenicidad de las partículas core/core-A

Para evaluar la capacidad inmunogénica de las partículas quiméricas que contienen el sitio A del VFA, se extrajeron por métodos no desnaturalizantes (*buffer* NP40 1%) las proteínas totales de células Sf9 co-infectadas con los baculovirus recombinantes AcNPVC y AcNPVCA en una proporción 3:1 y se vacunaron intraperitonealmente ratones adultos con 150 μ l de los extractos proteicos emulsionados con un volumen igual de adyuvante incompleto de Freund. Las vacunas contuvieron cantidades de proteína recombinante del orden de 50 μ g por animal de partículas mixtas core-A (conteniendo aproximadamente 0,5 μ g de sitio A). Los ratones control se inocularon con extractos proteicos provenientes de células infectadas con el baculovirus AcNPVC o células sin infectar como controles negativos o con 1 μ g de VFA inactivado químicamente y formulado en adyuvante incompleto.

Los animales recibieron dos dosis de refuerzo a los 21 y 42 días post primera inoculación, y quince días después del último refuerzo se tomaron muestras de suero y se realizaron experimentos de ELISA de captura para evaluar los niveles de anticuerpos totales. Veintiún días después del último refuerzo se evaluó la protección conferida por estos inmunógenos mediante ensayos de desafío viral con virus homólogo en ratón lactante.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12 y en la tabla 12.

12.2. Inmunogenicidad de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A

A pesar de no haber adoptado conformaciones que imiten epitopes discontinuos como los presentes en las partículas virales naturales, se ensayó la inmunogenicidad de las proteínas recombinantes P1Mir y P1Mir-2A vacunando ratones con extractos de células infectadas con cada baculovirus recombinante obtenidos con el *buffer* NP40. Las vacunas se formularon en adyuvante incompleto de Freund y contuvieron 100 μg de cada proteína recombinante por dosis, siguiendo el mismo esquema de inmunización y toma de muestras de suero descrito para la vacunación con las partículas *core/core-A*. Veintiún días después del último refuerzo se evaluó la protección conferida por estos inmunógenos en ratón lactante mediante ensayos de desafío viral con virus homólogo. Los ratones control se inocularon con extractos proteicos provenientes de células infectadas con el baculovirus AcNPVC o células sin infectar como controles negativos o con 1 μg de VFA inactivado químicamente y formulado en adyuvante incompleto como control positivo.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 12 y en la tabla 12.

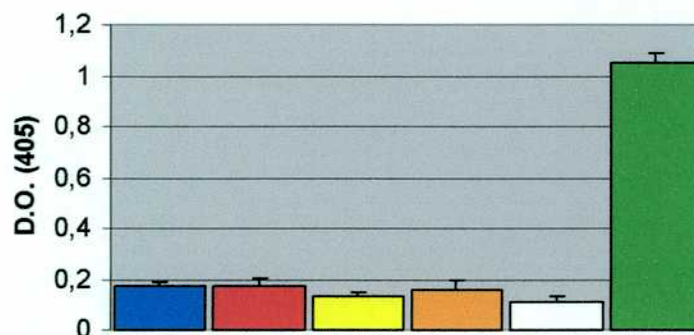


Figura 12. Evaluación de los anticuerpos anti-VFA conferidos por vacunación de ratones con las diferentes proteínas recombinantes: P1Mir (color naranja), P1Mir-2A (color azul) y las partículas quiméricas *core/core-A* (color rojo) expresadas en el sistema "baculovirus-células de insecto" y medidos en ensayos de ELISA de captura. Las muestras de suero fueron tomadas 15 días después

de la última inoculación, y se ensayaron diluidas 1:50. Como controles se utilizaron extractos de células de insecto sin infectar (color blanco), extractos proteicos conteniendo partículas *core* (color azul) y vacuna formulada con virus inactivado (color verde). Se representan los valores de D.O. obtenidos en ensayos de ELISA de captura como promedio de los valores de cada grupo con su barra de desvío estándar.

Formulación	Animales protegidos
<i>Sf9</i>	0/5
<i>core</i>	0/5
<i>core-sitio A</i>	0/5
<i>P1Mir</i>	0/5
<i>P1Mir-2A</i>	0/5
<i>virus inactivado</i>	5/5

Tabla 12. Evaluación de la protección frente al desafío viral conferida a ratones por las proteínas recombinantes P1, P1-2A y las partículas quiméricas *core/core-A* formuladas en adyuvante incompleto de Freund. Como controles negativos se usaron extractos de células sin infectar (*Sf9*) y partículas *core*, y como control positivo, virus aftoso inactivado. Se representan los animales protegidos sobre el total de evaluados.

Los resultados de ELISA y de protección mostraron que las partículas quiméricas no fueron eficaces inmunógenos para montar una respuesta inmune protectora ni para despertar en ratones niveles de anticuerpos medibles en ensayos de ELISA. Esta ausencia de inmunogenicidad contrasta con experimentos anteriores realizados por Clarke y colaboradores, en los que una única dosis de partículas *core-A* de 2 µg o dos dosis de 0,2 µg protegieron cobayos contra el desafío con virus aftoso de serotipo O (Clarke *et al.*, 1987). Las posibles diferencias entre estos resultados pueden ser atribuidas entre otras a la diferencia de inmunogenicidad de las distintas secuencias derivadas del VFA de los distintos serotipos, a la menor concentración de secuencias derivadas del VFA C3Arg85 en las preparaciones vacunales, a la menor densidad de epitopes en las partículas mixtas *core/core-A* o a combinaciones de éstas.

Los resultados mostraron que ambas proteínas precursoras fueron incapaces de despertar una respuesta inmune protectora frente al desafío viral. Tampoco fue posible detectar anticuerpos específicos contra el virus en ensayos de ELISA. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Grubman (Grubman *et al.*, 1993), en los que se muestra que la inoculación con una proteína precursora P1 del serotipo O

indujo una pobre respuesta inmune protectora en cerdos. Debido a que este precursor no fue diseñado para ser miristilado en su extremo amino terminal, Saiz y colaboradores atribuyeron estos resultados a la ausencia de un correcto plegamiento espacial necesario para generar epitopes complejos involucrados en la neutralización del VFA. A pesar de que ambos precursores P1 y P1-2A, derivados de secuencias del VFA C3Arg85 fueron diseñados para ser miristilados en un sistema de expresión eucariótico, esta modificación tampoco permitió que ambas proteínas adoptaran un plegamiento adecuado, sugiriendo que las diferencias en las secuencias de P1 de los tipos C1 y C3 pueden ser responsables de los resultados contradictorios entre nuestro laboratorio y los de Saiz y colaboradores y la coincidencia entre los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y los obtenidos por Grubman y colaboradores.

13. Expresión de proteínas derivadas del VFA en la superficie de baculovirus y de células de insecto

Los baculovirus han sido usados por más de una década como sistema para la expresión de proteínas recombinantes. El miembro tipo de la familia *Baculoviridae*, AcNPPV, codifica una glicoproteína de superficie del virión, gp64, responsable de la entrada por fusión del virus a la célula hospedadora en cultivos celulares. Esta glicoproteína de transmembrana está presente no sólo en la superficie de las partículas virales, sino también en las células de insecto infectadas.

La similitud entre esta proteína y la proteína p-3 del bacteriófago M13 llevó al desarrollo de sistemas similares al *phage display* usando baculovirus.

Teniendo en cuenta la localización celular y viral de la glicoproteína gp64, y en base a los conocimientos sobre sitios de inserción de secuencias heterólogas en la secuencia de gp64, la expresión de antígenos simples y complejos como fusiones a esta proteína puede resultar en un sistema de presentación antigénica alternativo a los presentados anteriormente, en los que los antígenos se presentan al sistema inmune de manera multimérica, anclados a un soporte lipídico, y de sencilla purificación, formando parte de vacunas altamente seguras.

14. Construcción del plásmido universal pVLSupI

Con el objeto de expresar fusiones entre secuencias de interés y la glicoproteína gp64 en la superficie de baculovirus y de células de insecto, se construyó el

plásmido pVLSupI. Para ello se diseñaron pares de oligonucleótidos con los que se amplificaron por PCR las secuencias codificantes para el péptido señal de gp64 y la glicoproteína gp64 madura, incluyendo su secuencia de anclaje a membrana. Entre ambas secuencias se insertó una secuencia de 18 pares de bases correspondientes a un sitio múltiple de clonado (SMC) en fase, de manera que la traducción a partir del codón de iniciación AUG del péptido señal añade 6 aminoácidos entre éste y la secuencia de gp64 madura no presentes en la secuencia natural. La secuencia del SMC es aportada por el oligonucleótido de polaridad negativa con el que se amplificó la secuencia señal. Los diferentes pasos secuenciales para colocar esta nueva copia de gp64 bajo la regulación del promotor de la proteína poliedrina se resumen en la figura 14.1.

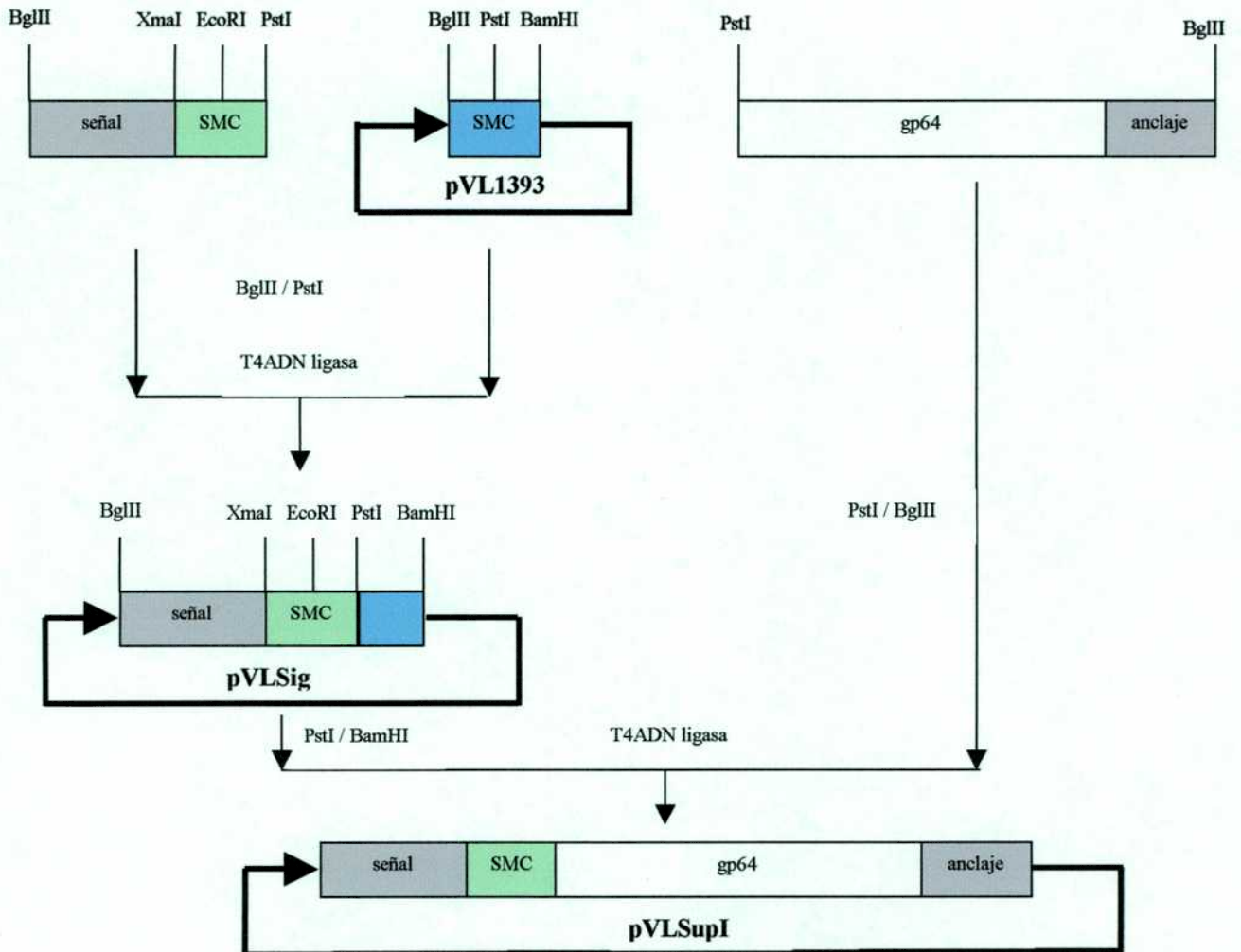


Figura 14.1. Construcción de los plásmidos pVLSig y pVLSupI. El producto de PCR conteniendo el péptido señal y un sitio de clonado múltiple se clonó en pVL1393 para originar pVLSig. En este vector intermediario se clonó el producto de PCR codificante para gp64 madura y su secuencia de anclaje para originar pVLSupI.

Las secuencias relevantes del plásmido pVLSupI se resumen en la figura 14.2.

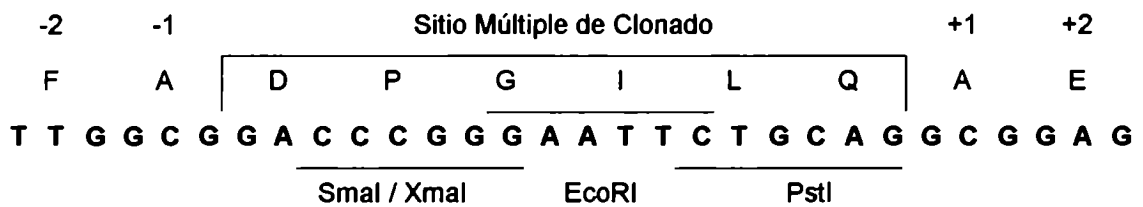


Figura 14.2. Secuencias relevantes del plásmido pVLSupI. Se insertó un sitio múltiple de clonado SmaI, EcoRI y PstI entre la secuencia señal y la secuencia de gp64 madura, agregando 6 aminoácidos extra. Se señalan los dos últimos aminoácidos del péptido señal (posiciones -1 y -2) y los dos primeros de gp64 (posiciones +1 y +2).

15. Construcción del plásmido pVLSupA

Con el objeto de expresar la fusión entre la glicoproteína gp64 y el sitio antigénico A del VFA en este sistema, el dúplex de ADN codificante para este sitio antigénico generado por hibridación con los oligonucleótidos A138 y A156 como se describe en Materiales y Métodos se digirió con las enzimas de restricción XmaI y PstI y se clonó entre los sitios XmaI y PstI del plásmido pVLSupI. La secuencia insertada de esta manera está en marco de lectura con la secuencia señal y la secuencia de gp64 madura.

Para confirmar la presencia de la secuencia del sitio A, se digirieron los plásmidos recombinantes preparados a partir de bacterias transformadas y se seleccionaron aquellos clones que por digestión con la enzima de restricción NcoI desprendieron una banda de aproximadamente 1600 pb (un sitio NcoI se encuentra en el extremo de la secuencia del sitio A y el otro en la secuencia codificante para la proteína gp64). La estrategia de clonado se detalla en la figura 15.1.

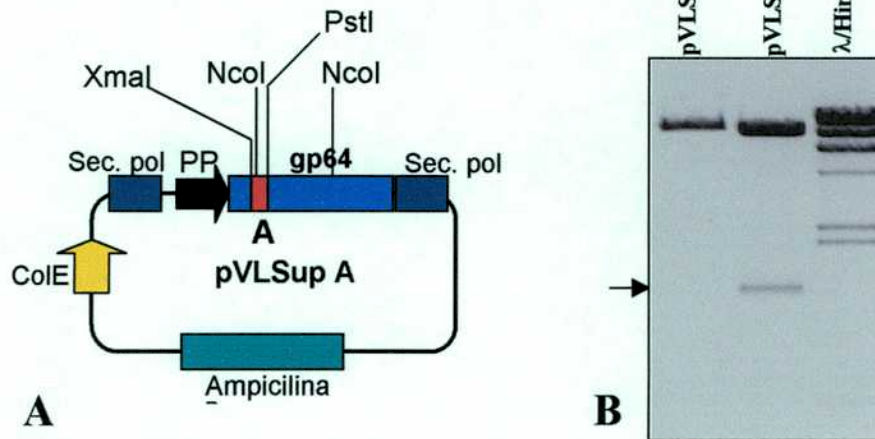


Figura 15.1. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupA. A. La secuencia codificante para el sitio A (A) del VFA se clonó entre los sitios Xmal y PstI del SMC del vector pVLSupI ubicado entre la secuencia señal y la secuencia de gp64, bajo la regulación del promotor de poliedrina (PP). Flanqueando el promotor y el gen de interés existen secuencias del locus poliedrina para permitir la recombinación homóloga con el genoma de baculovirus (Sec.pol). Se indica la posición de los sitios de restricción NcoI utilizados para la confirmación de la presencia del inserto. B. Se seleccionaron aquellos clones que por digestión con la enzima de restricción NcoI desprendieron una banda de 1500 pb aproximadamente (indicada con una flecha).

Las diferentes secuencias relevantes de éste plásmido se esquematizan en la figura 15.2.

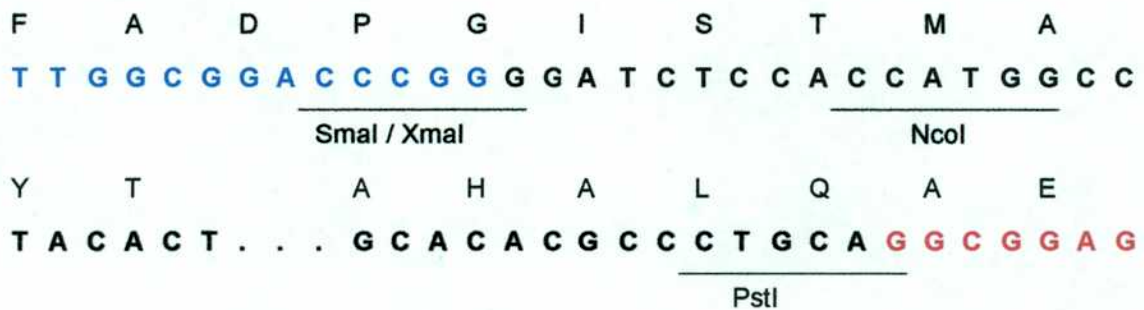


Figura 15.2. Secuencias relevantes del plásmido pVLSupA. La secuencia codificante para el sitio antigénico A del VFA (color negro) se clonó entre los sitios Xmal y PstI del plásmido pVLSupI. Se indican en color azul las secuencias derivadas del péptido señal y en color rojo, las derivadas del polipéptido gp64 maduro.

16. Construcción del plásmido pVLSupP1

Para expresar la fusión entre la glicoproteína gp64 y la poliproteína P1 del VFA en este sistema, se amplificó su secuencia mediante PCR empleando los

oligonucleótidos P1-1 y P1-2 como se describe en Materiales y Métodos y se clonó su secuencia codificante en los sitios XmaI y PstI del plásmido pVLSupI. La secuencia insertada de esta manera está en marco de lectura con la secuencia señal y la secuencia de gp64 madura. Para confirmar la presencia de la secuencia P1, se digirieron los plásmidos recombinantes preparados a partir de bacterias transformadas y se seleccionaron aquellos clones que por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y PstI desprendieron una banda de aproximadamente 2100 pb (el sitio EcoRI se encuentra en el extremo de la secuencia de P1 y el sitio PstI en el SMC río arriba de la secuencia de gp64). La estrategia de clonado se detalla en la figura 16.1.

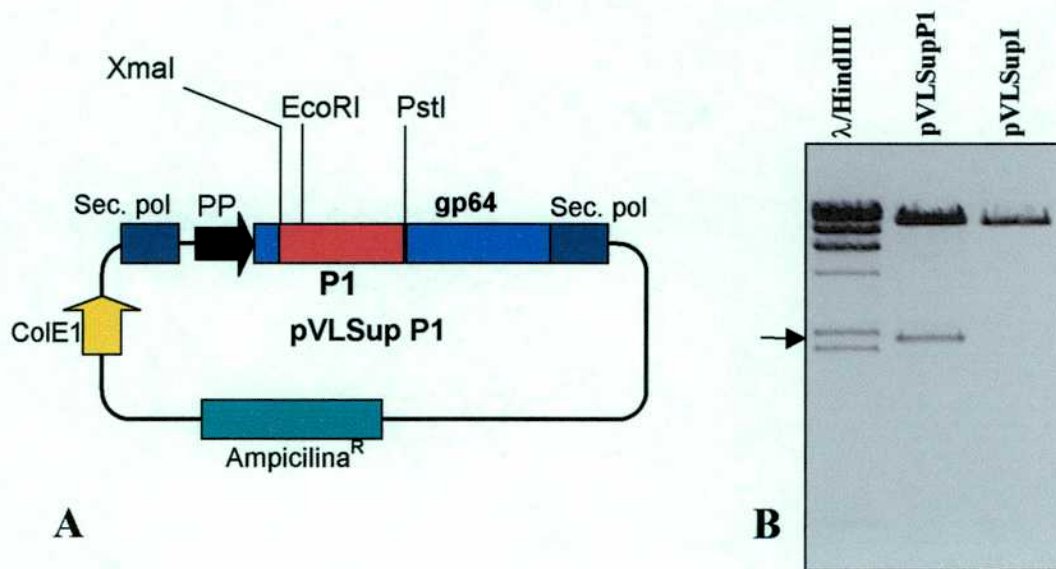


Figura 16.1. Construcción del plásmido de transferencia pVLSupP1. A. La secuencia codificante para la poliproteína P1 del VFA se clonó entre los sitios XmaI y PstI del SMC del vector pVLSupI ubicado entre la secuencia señal y la secuencia de gp64, bajo la regulación del promotor de poliedrina (PP). Flanqueando el promotor y el gen de interés existen secuencias del locus poliedrina para permitir la recombinación homóloga con el genoma de baculovirus (Sec.pol). Se indica la posición de los sitios de restricción EcoRI y PstI utilizados para la confirmación de la presencia del inserto. B. Se seleccionaron aquellos clones que por digestión con las enzimas de restricción EcoRI y PstI desprendieron una banda de 2100 pb aproximadamente (indicada con una flecha).

Las diferentes secuencias relevantes de éste plásmido se esquematizan en la figura 16.2.

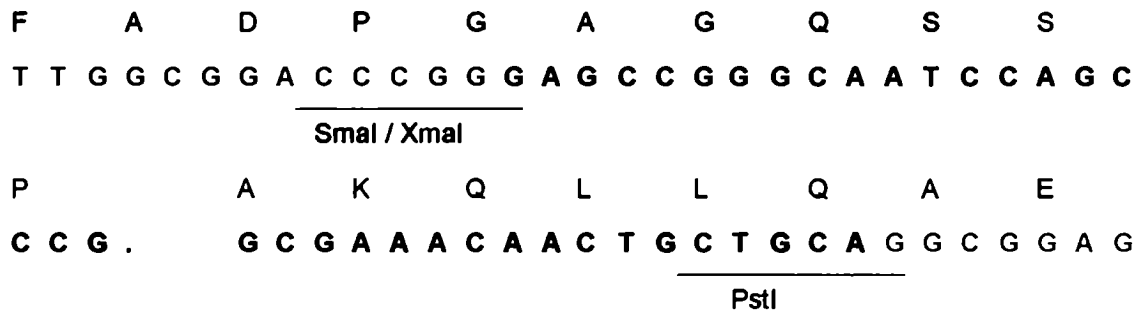


Figura 16.2. Secuencias relevantes del plásmido pVLSupP1. La secuencia codificante para la poliproteína P1 del VFA (color negro) se clonó entre los sitios XmaI y PstI del plásmido pVLSupI. Se indican en color azul las secuencias derivadas del péptido señal y en color rojo, las derivadas del polipéptido gp64 maduro.

17. Obtención de los baculovirus recombinantes Acgp64, AcSupA y AcSupP1

Las diferentes construcciones plasmídicas para generar las fusiones entre proteínas derivadas del VFA y gp64 fueron realizadas en base al plásmido de transferencia pVL1393. Como se describió en el ítem 3.1., este plásmido es compatible con el kit comercial BaculoGold, por lo que la cotransfección origina baculovirus recombinantes en proporciones superiores al 99%.

18. Expresión de las proteínas de fusión con gp64

Para evaluar la expresión de las proteínas de fusión entre sitios antigénicos derivados del VFA y gp64, se infectaron células Sf9 con cada clón y 4 días después se extrajeron las proteínas totales celulares con *buffer* de siembra 2 X. Estas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% y se detectaron las proteínas recombinantes mediante *Western blot* con el anticuerpo monoclonal AcV5 o con un *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A. Los resultados de estos experimentos se muestran en la figura 18.1.

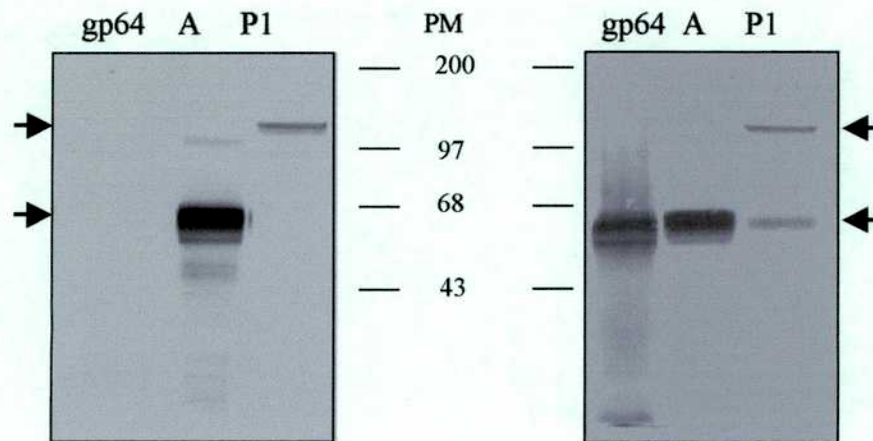


Figura 18.1. Detección de las proteínas de fusión VFA-gp64 en extractos de células infectadas. Las proteínas recombinantes gp64, A-gp64 (A) y P1-gp64 (P1) se revelaron mediante *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A (panel A) o anti gp64 (panel B). Las flechas indican la posición de las diferentes proteínas y en el centro se indican los pesos moleculares de referencia en kDa (PM).

De los resultados obtenidos se desprende que los extractos celulares exhibieron bandas reactivas con anticuerpos específicos contra el sitio A de 137 kDa y 66 kDa, los pesos moleculares esperados para las fusiones P1-gp64 y A-gp64 respectivamente. Estas mismas dos bandas se detectaron también cuando se empleó el anticuerpo monoclonal AcV5, detectándose además una banda adicional en extractos celulares infectados con ACSupP1. Esta banda representa la copia salvaje de gp64, y es indistinguible de la proteína de fusión A-gp64 en los extractos celulares infectados con AcSupA al nivel de resolución empleado, ya que sólo difieren en 21 aminoácidos. Como se esperaba, no se observaron bandas reactivas en extractos celulares provenientes de infecciones con los baculovirus Acgp64 cuando se empleó el *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A.

En experimentos de cinética de expresión se observó que el máximo rendimiento se obtiene a los 4 días post infección, tanto para los recombinantes AcSupA como para ACSupP1 (datos no mostrados).

Para evaluar la presencia de proteínas recombinantes en los sobrenadantes de infección, éstos se ultracentrifugaron a 32.000 rpm por 1,5 h a 20°C en un rotor SS34. Se lavaron y resuspendieron los *pellets* en PBS pH 6,2 concentrándolos 200 veces y se extrajeron las proteínas mezclando estas suspensiones con un volumen igual de *buffer* de ruptura. Éstas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida 10% y se detectaron las proteínas recombinantes mediante *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A. Los resultados se presentan en la figura 18.2.

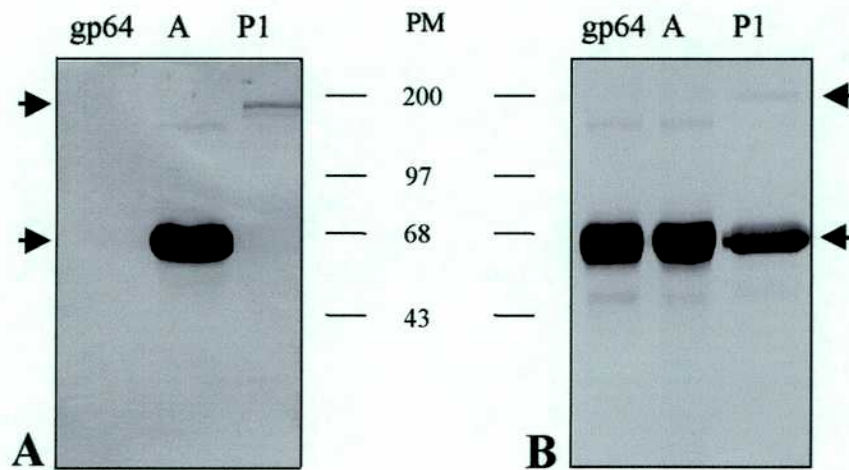


Figura 18.2. Detección de las proteínas de fusión VFA-gp64 en sobrenadantes de células infectadas. Las proteínas recombinantes gp64, A-gp64 (A) y P1-gp64 (P1) se revelaron mediante *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A (panel A) o anti gp64 (panel B). Las flechas indican la posición de las diferentes proteínas y en el centro se indican los pesos moleculares de referencia en kDa (PM).

Las figuras anteriores muestran que las mismas proteínas identificadas en los extractos celulares fueron detectadas en los sobrenadantes de infección con los baculovirus recombinantes.

La presencia de estas proteínas recombinantes en el sobrenadante de células infectadas es consistente con la presencia de las fusiones VFA-gp64 en la superficie de baculovirus. Sin embargo, se ha observado proteína gp64 secretada al sobrenadante en cultivos de baculovirus salvajes (Jarvis & García, 1994), por lo que su localización fue evaluada por otros métodos adicionales (ítem 20).

Como se muestra en las figuras anteriores, los niveles de expresión de la proteína de fusión A-gp64 fueron marcadamente más altos que los de la fusión P1-gp64 (aproximadamente 13 veces más, estimado por densitometría) cuando se sembró

el mismo número de células infectadas en el gel de electroforesis. De manera similar, la proteína de fusión A-gp64 fue más eficientemente incorporada en la partícula viral recombinante que la fusión P1-gp64, dado que la banda reactiva correspondiente a A-gp64 fue aproximadamente 35 veces más intensa que la de P1-gp64, a pesar de que se emplearon sobrenadantes de infección de títulos virales semejantes.

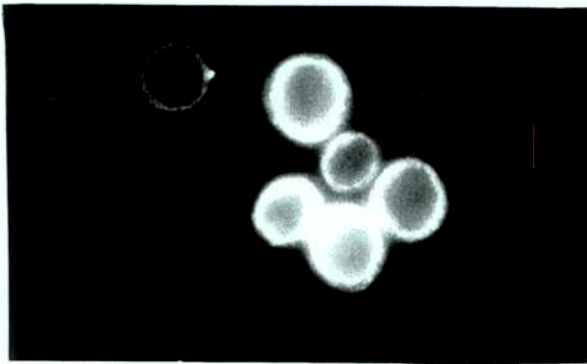
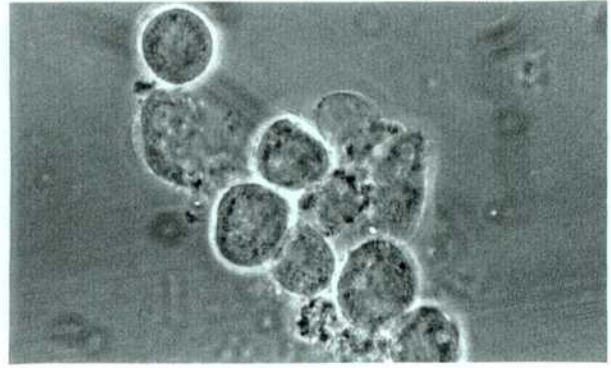
19. Detección de las proteínas recombinantes en la membrana de células de insecto

Debido a que gp64 en baculovirus salvajes es una glicoproteína de membrana, se evaluó la presencia de las fusiones VFA-gp64 en la membrana de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes. Para ello se llevaron a cabo experimentos de inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales anti sitio A. Las células se infectaron a una moi de 10 y se cosecharon 3 días post infección, utilizando como control negativo células de insecto sin infectar y células infectadas con el baculovirus Acgp64. Los resultados se muestran en la figura 19.1.

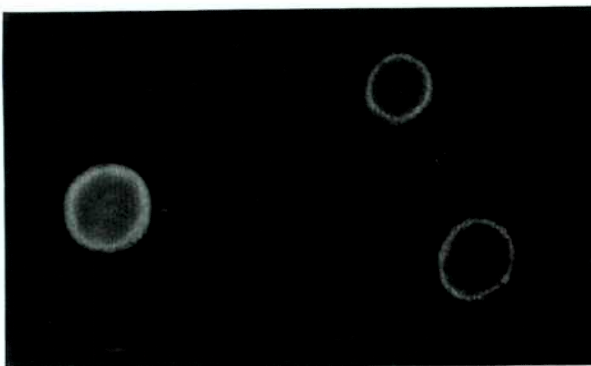
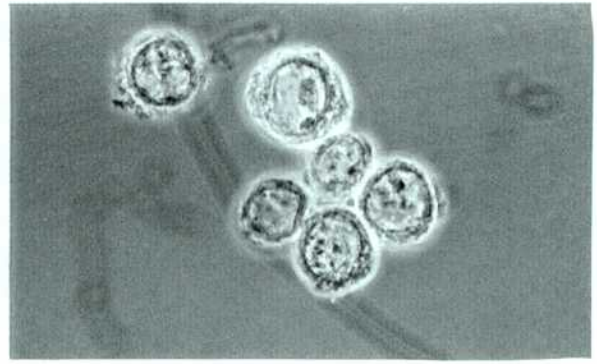
La microscopía mostró una fuerte fluorescencia periférica en las células infectadas con AcSupP1 y AcSupA, ausente en células sin infectar o células infectadas con el baculovirus recombinante Acgp64. Estos resultados son compatibles con la presencia de las fusiones de los antígenos del VFA con la proteína gp64 en la superficie de las células de insecto infectadas.



A



B



C

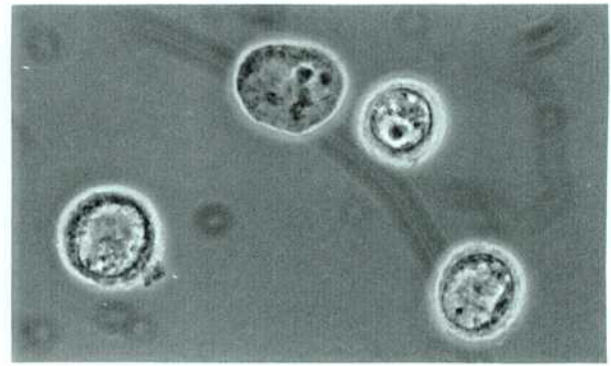


Figura 19. Inmunofluorescencia de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes. Las células fijadas infectadas con los baculovirus Acgp64 (panel A), AcSupA (panel B) o AcSupP1 (panel C) se incubaron con anticuerpos monoclonales específicos contra el VFA y se tificaron con un segundo anticuerpo conjugado con fluoresceína. En los paneles de la derecha se muestran las fotografías de contraste de fase.

20. Detección de las proteínas recombinantes en la superficie de los baculovirus recombinantes

Para confirmar la incorporación de las proteínas de fusión P1-gp64 y A-gp64 a la superficie de los baculovirus recombinantes AcSupP1 y AcSupA respectivamente, se infectaron células Sf9 a una moi de 0,1 y 4 días más tarde se cosecharon los sobrenadantes. Éstos se clarificaron, se filtraron a través de membranas de 0,45 μ m, se concentraron por ultracentrifugación y se sembraron sobre gradientes discontinuos de sacarosa 25-60%. Se ultracentrifugaron los gradientes y se desarmaron desde el fondo del tubo, colectandose 10 fracciones. Se removió la sacarosa por dilución en PBS y ultracentrifugación, y de cada fracción se calculó el título viral por ensayo de placa y se evaluó la presencia de proteína recombinante por ensayos de *Western blot* con un *pool* de anticuerpos monoclonales anti sitio A. Los resultados se muestran en la figura 20.1.

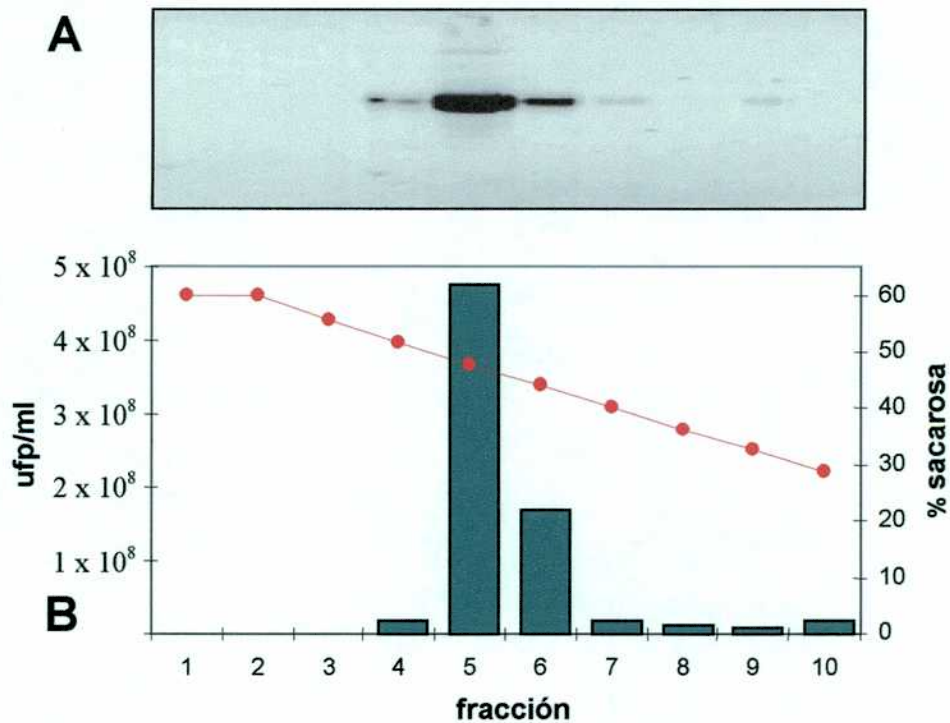


Figura 20.1. Localización de las proteínas de fusión con gp64. Los sobrenadantes de células infectadas se ultracentrifugaron y los virus concentrados se sembraron sobre gradientes de sacarosa 25-60% para confirmar la asociación de las proteínas recombinantes a los viriones. De cada fracción se ensayó la reactividad en *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A (panel A) y la presencia de virus por ensayos de placa (panel B).

Como muestra la figura 20.1, en los experimentos de *Western blot* se detectó reactividad en las fracciones correspondientes a concentraciones de sacarosa 45-47%, posición esperada para baculovirus extracelulares bajo las condiciones de ultracentrifugación empleadas. Estos picos correlacionaron con las fracciones de más alto título viral, como se desprende de las figuras de los experimentos de ensayos de placa.

21. Propiedades antigénicas de los baculovirus que expresan las fusiones VFA-gp64

Con el objeto de ensayar la accesibilidad de los sitios antigénicos expuestos en la superficie de los baculovirus recombinantes AcSupA y AcSupP1 y evaluar la capacidad de ambos virus para competir con virus aftoso entero por la unión a un panel de anticuerpos monoclonales, se realizaron experimentos de competencia por el antígeno mediante ensayos de ELISA. Los anticuerpos monoclonales utilizados en este experimento son representativos de un panel mayor de anticuerpos neutralizantes y no neutralizantes que reconocen epitopes localizados en el sitio antigénico A del VFA C3-85.

En la tabla 21.1. se grafican los índices de competencia relativa respecto del VFA entero de cada baculovirus recombinante con cada anticuerpo monoclonal ensayado.

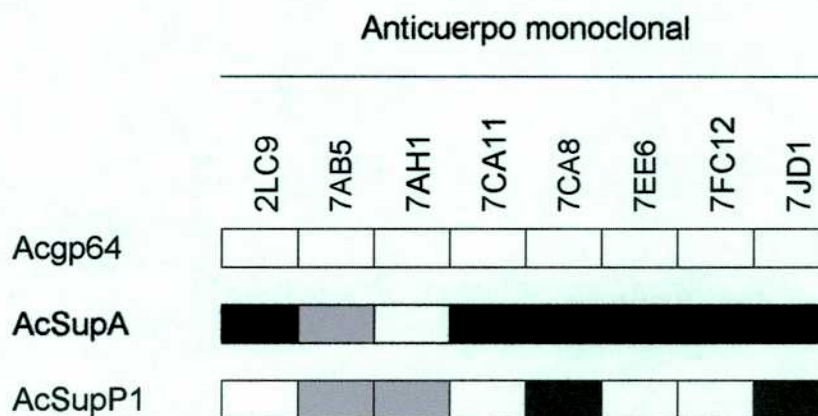


Tabla 21.1. Índices de competencia relativa de los diferentes baculovirus recombinantes con un panel de anticuerpos monoclonales secuenciales. Los distintos niveles de competencia con el VFA entero por los distintos anticuerpos monoclonales se representan como índices de competencia relativa (ICR). En color negro se muestran los valores de competencia positivos ($10 > ICR > 1$), en color gris los intermedios ($100 > ICR > 10$) y en color blanco, los negativos ($ICR > 100$).

De los resultados obtenidos puede observarse que el baculovirus AcSupA compitió mejor que AcSupP1 por los monoclonales 2LC9, 7CA11, 7EE6 y 7FC12, mientras que AcSupP1 compitió mejor que AcSupA por el monoclonal 7AH1. Como se esperaba, el baculovirus Acgp64 no compitió con el VFA por la unión a ningún anticuerpo monoclonal.

22. Propiedades inmunogénicas de los baculovirus que expresan las fusiones VFA-gp64 y de células infectadas con éstos

Para evaluar la capacidad inmunogénica de los baculovirus recombinantes y las células de insecto infectadas, se vacunaron ratones con dichos inmunógenos por diferentes vías y con diferentes adyuvantes. Se evaluó entonces la respuesta conferida por las diferentes construcciones mediante ELISA, seroneutralizaciones y ensayos de protección al desafío viral. Los resultados se presentan a continuación:

Vacunación con células infectadas

Se vacunaron grupos de 6 ratones con 10^7 células infectadas con los baculovirus recombinantes AcSupA o AcSupP1 por diferentes vías. Esta cantidad de células infectadas contiene en total aproximadamente 100 μg de la proteína de fusión gp64-sitioA (conteniendo aproximadamente 3 μg de sitio A) y 200 μg de la proteína de fusión gp64-P1 (conteniendo aproximadamente 110 μg de P1) Como control negativo se usaron células infectadas con el baculovirus Acgp64, y como control positivo, VFA inactivado. Cada inmunógeno se inoculó en forma de células resuspendidas en PBS (intraperitonealmente) o con adyuvante incompleto de Freund (subcutáneamente). A diferentes intervalos post inoculaciones se tomaron muestras de suero, y se realizaron experimentos de ELISA de captura para evaluar los niveles de anticuerpos totales (Figuras 22.1 y 22.2) y de seroneutralización en placa (Figuras 22.3 y 22.4) para evaluar los niveles de anticuerpos neutralizantes. Finalmente se realizaron experimentos de protección (Tabla 22.1) para evaluar la respuesta inmune protectora frente al desafío viral.

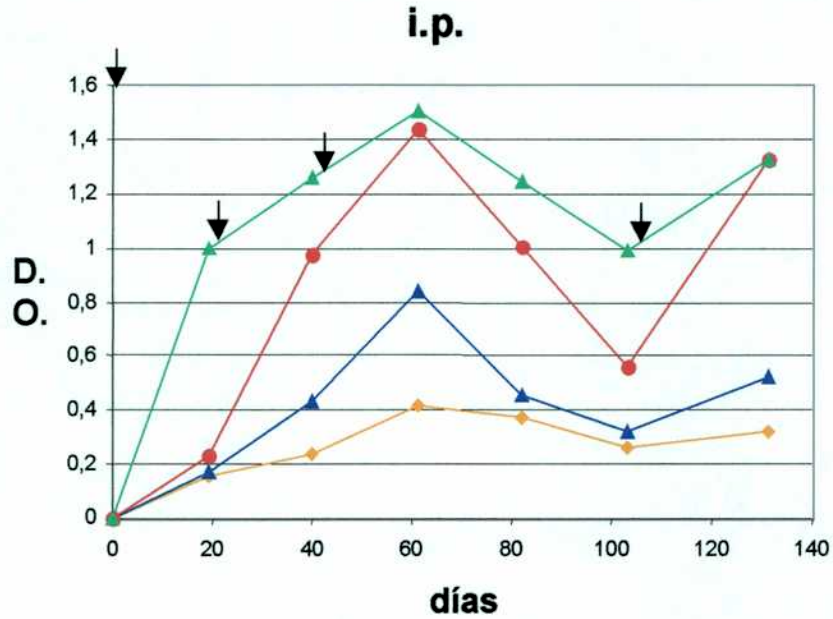


Figura 22.1. Ensayos de ELISA contr VFA de ratones vacunados con células infectadas con baculovirus recombinantes. El gráfico muestra los valores de densidad óptica (D.O.) de los sueros diluidos 1:100 en ensayos de ELISA de captura contra VFA. Se indican los días de las sangrías y las fechas indican la aplicación de las dosis refuerzo. En color rojo se indican los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con el baculovirus AcSupA; en azul, los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con el baculovirus AcSupP1; en color naranja los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con el baculovirus AcSupA y en color verde, los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con VFA inactivado.

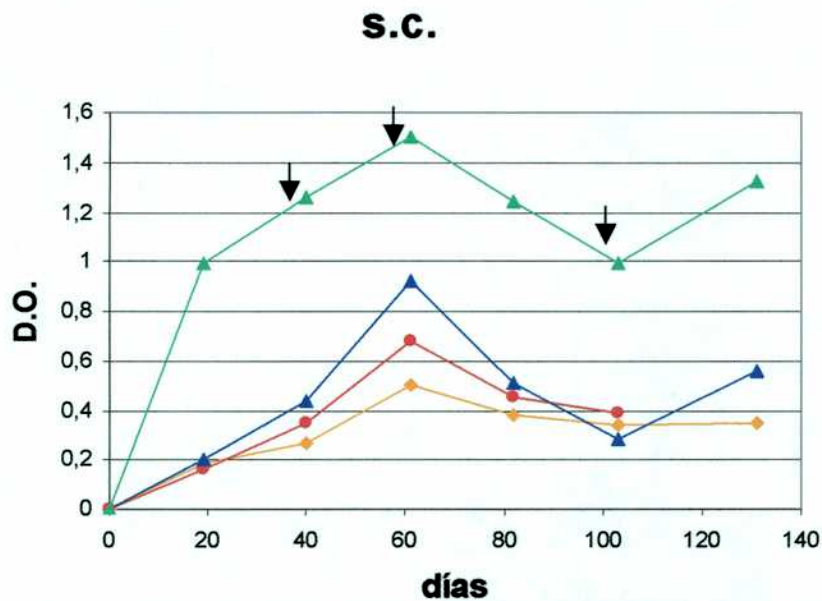


Figura 22.2. Vacunación subcutánea de ratones con células infectadas. El gráfico muestra los valores de densidad óptica (D.O.) de los sueros diluidos 1:100 en ensayos de ELISA de captura contra VFA. Se indican los días de las sangrías y las fechas indican la aplicación de las dosis refuerzo. En color rojo se indican los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con el baculovirus AcSupA; en azul, los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con el baculovirus AcSupP1; en color naranja los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con el baculovirus AcSupA y en color verde, los valores promedio de los animales vacunados con células infectadas con VFA inactivado.

Los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA mostraron que la vacunación con células infectadas con el baculovirus AcSupA despertó en los animales vacunados intraperitonealmente una respuesta humoral comparable a la despertada por la vacuna convencional a virus aftoso inactivado, a medir por los títulos obtenidos. Esta respuesta se hace más semejante con las dosis refuerzo, observándose gran similitud entre ambos grupos en respuesta a los refuerzos en función del tiempo. La respuesta de los animales vacunados subcutáneamente con células infectadas con AcSupA no tuvo diferencias significativas con el grupo control, células infectadas con Acgp64.

Por otro lado, la vacunación intraperitoneal con células infectadas con el baculovirus AcSupP1 no despertó niveles de anticuerpos significativos. Estos fueron más altos cuando la vacuna se formuló en adyuvante oleoso y se inyectó subcutáneamente.

Los resultados de los experimentos de seroneutralización mostraron que las células infectadas con el baculovirus recombinante AcSupA fueron capaces de despertar anticuerpos con capacidad de neutralizar *in vitro* la infectividad del VFA en células BHK. Esta respuesta fue homogénea en los diferentes animales de este grupo, aunque con diferentes títulos seroneutralizantes. 5 de 6 animales de este grupo mostraron títulos que alcanzaron el 50% de reducción en el número de placas de lisis que estuvieron en el rango de diluciones 1:10 y 1:100 (3/5) o 1:100 y 1:100 (2/5), y sólo 1 animal alcanzó niveles de reducción superiores al 50% a la menor dilución (62%). Esta respuesta fue similar, aunque menor, a la obtenida con los sueros de ratones vacunados con la vacuna convencional (1 µg de virus inactivado). Por otro lado, ningún animal vacunado con células infectadas con el baculovirus AcSupP1 mostró títulos significativos de seroneutralización. La respuesta obtenida fue similar a la del grupo control, animales vacunados con el baculovirus Acgp64. En ambos grupos todos los animales mostraron niveles de reducción de la infectividad superiores al 90% en las diluciones menores.

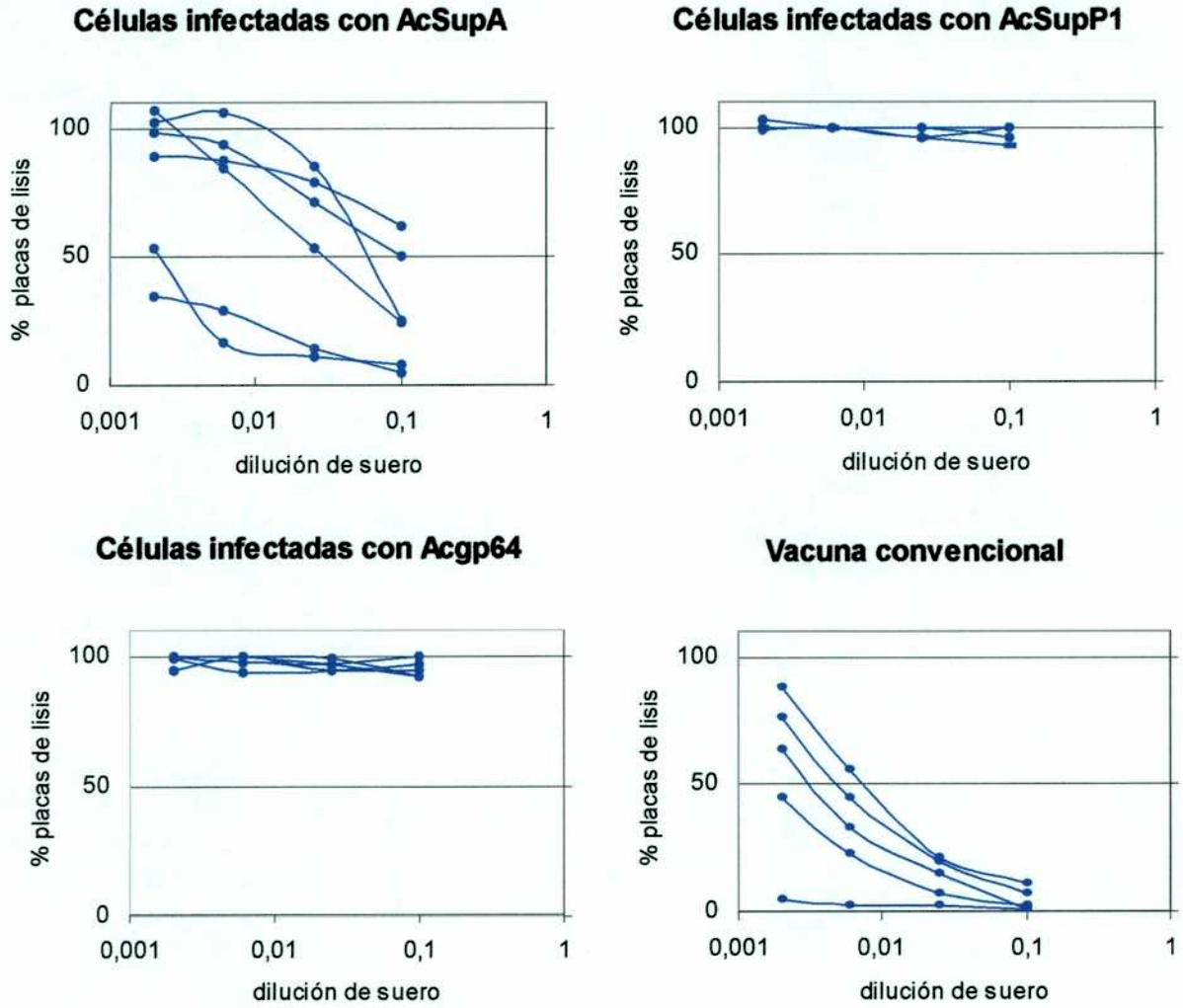


Figura 22.3. Ensayos de seroneutralización del VFA de ratones vacunados con células infectadas con baculovirus recombinantes. Los sueros de animales vacunados se diluyeron en medio de cultivo y se midió entonces su capacidad neutralizante por ensayos de neutralización de la infectividad de VFA en células BHK. Los gráficos muestran la reducción en el número de placas de lisis de diluciones seriadas de los sueros de los animales vacunados. Cada curva corresponde a un animal individual.

Vacuna		Animales protegidos
gp64	<i>ip</i>	0/6
	<i>sc</i>	0/6
SupA	<i>ip</i>	6/6
	<i>sc</i>	3/6
SupA*	<i>ip</i>	5/6
	<i>sc</i>	nd
SupP1	<i>ip</i>	2/6
	<i>sc</i>	nd
SupP1*	<i>ip</i>	2/6
	<i>sc</i>	1/5
PBS	<i>ip</i>	0/4
	<i>sc</i>	0/4
Virus inactivado	<i>ip</i>	4/4
	<i>sc</i>	4/4

Tabla 22.1. Protección conferida por la vacunación con células infectadas con baculovirus recombinantes. Los animales vacunados fueron desafiados en el día 145. Como controles positivo y negativos se usaron ratones vacunados con VFA inactivado, con PBS o con células infectadas con el baculovirus Acgp64, respectivamente. Los resultados se expresan como animales protegidos/animales desafiados.

* Grupos de animales que no recibieron dosis refuerzo al día 105. Estos grupos fueron también desafiados al día 145. *nd*: no determinado, *ip*: intraperitoneal, *sc*: subcutáneo.

Los experimentos de desafío con virus homólogo mostraron que la vacunación intraperitoneal (en ausencia de adyuvantes) con células infectadas con el baculovirus AcSupA logró conferir protección al 100% de los ratones desafiados (tabla 22.1.). Los altos niveles de protección (83% de los animales desafiados) subsistieron por períodos prolongados, más de 100 días después de la última dosis de refuerzo.

La vacunación subcutánea con la misma vacuna sólo protegió el 50% de los animales desafiados, a pesar de haber sido formulada en adyuvante oleoso. Este hecho correlacionó con los bajos niveles de anticuerpos observados para este grupo en los ensayos de ELISA.

Las vacunas formuladas con células infectadas con el baculovirus recombinante AcSupP1 sólo confirieron una baja protección (33% de los animales desafiados) cuando se inocularon intraperitonealmente sin adyuvante. La vacunación subcutánea con la misma vacuna formulada en adyuvante incompleto protegió al 20% de los animales desafiados a pesar de haber mostrado este grupo mayores niveles de anticuerpos que los del grupo vacunado intraperitonealmente.

Vacunación con baculovirus recombinantes

Se vacunaron grupos de 6 ratones con 10^6 baculovirus recombinantes AcSupA o AcSupP1 por vía intraperitoneal. Esta cantidad de baculovirus recombinantes contiene aproximadamente 36 μg de la proteína de fusión gp64-sitioA (conteniendo aproximadamente 1 μg de sitio A) y 6 μg de la proteína de fusión gp64- la proteína de fusión gp64-P1 (conteniendo aproximadamente 3,2 μg de P1). Como control negativo se utilizó el baculovirus Acgp64, y como control positivo, VFA inactivado formulado en adyuvante incompleto. Cada inmunógeno se inoculó en la forme de baculovirus resuspendidos en PBS o con adyuvante incompleto de Freund. Veintiún días después de la primera inoculación se aplicaron dos dosis refuerzo (separadas por 21 días), se tomaron muestras de suero 15 días después y se realizaron ensayos de ELISA de captura para evaluar los niveles de anticuerpos totales (Figura 1) y de seroneutralización en plac(Figura 2) para evaluar los niveles de anticuerpos neutralizantes.

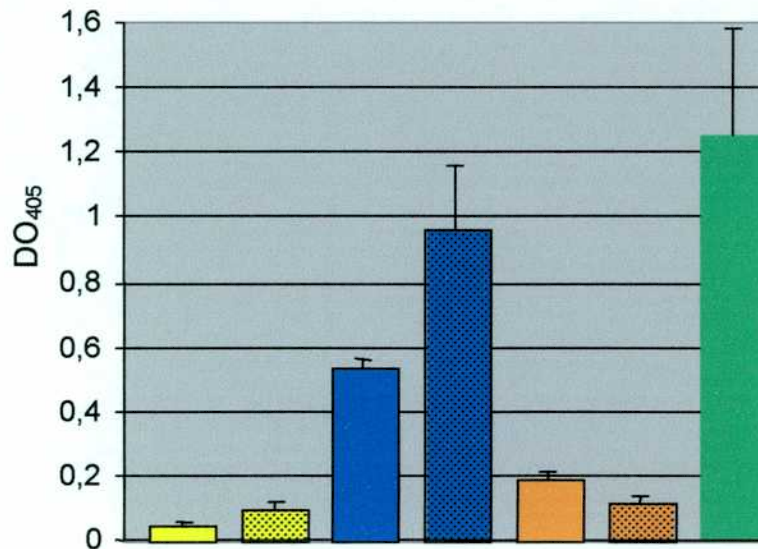


Figura 22.4. Ensayo de ELISA anti VFA de ratones vacunados con baculovirus recombinantes. El gráfico muestra los valores de densidad óptica (D.O.) de los sueros diluidos 1:100 en ensayos de ELISA de captura. Los valores de D.O de los animales vacunados sin adyuvante se representan con columnas de color uniforme y los de los animales vacunados con baculovirus formulados en adyuvante incompleto se representan con columnas punteadas (color amarillo: Acgp64, color azul: AcSupA, color naranja: AcSupP1 y color verde: VFA)

Los ensayos de ELISA mostraron que la vacunación con los baculovirus AcSupA despertó en el grupo de animales vacunados una respuesta humoral, aún en ausencia de adyuvante. El grupo de animales vacunados con los baculovirus AcSupP1 no mostró diferencias en niveles de anticuerpos respecto del grupo control, animales vacunados con los baculovirus Acgp64. En todos los casos, los niveles de anticuerpos fueron menores a los obtenidos con la vacuna formulada con VFA inactivado en adyuvante incompleto.

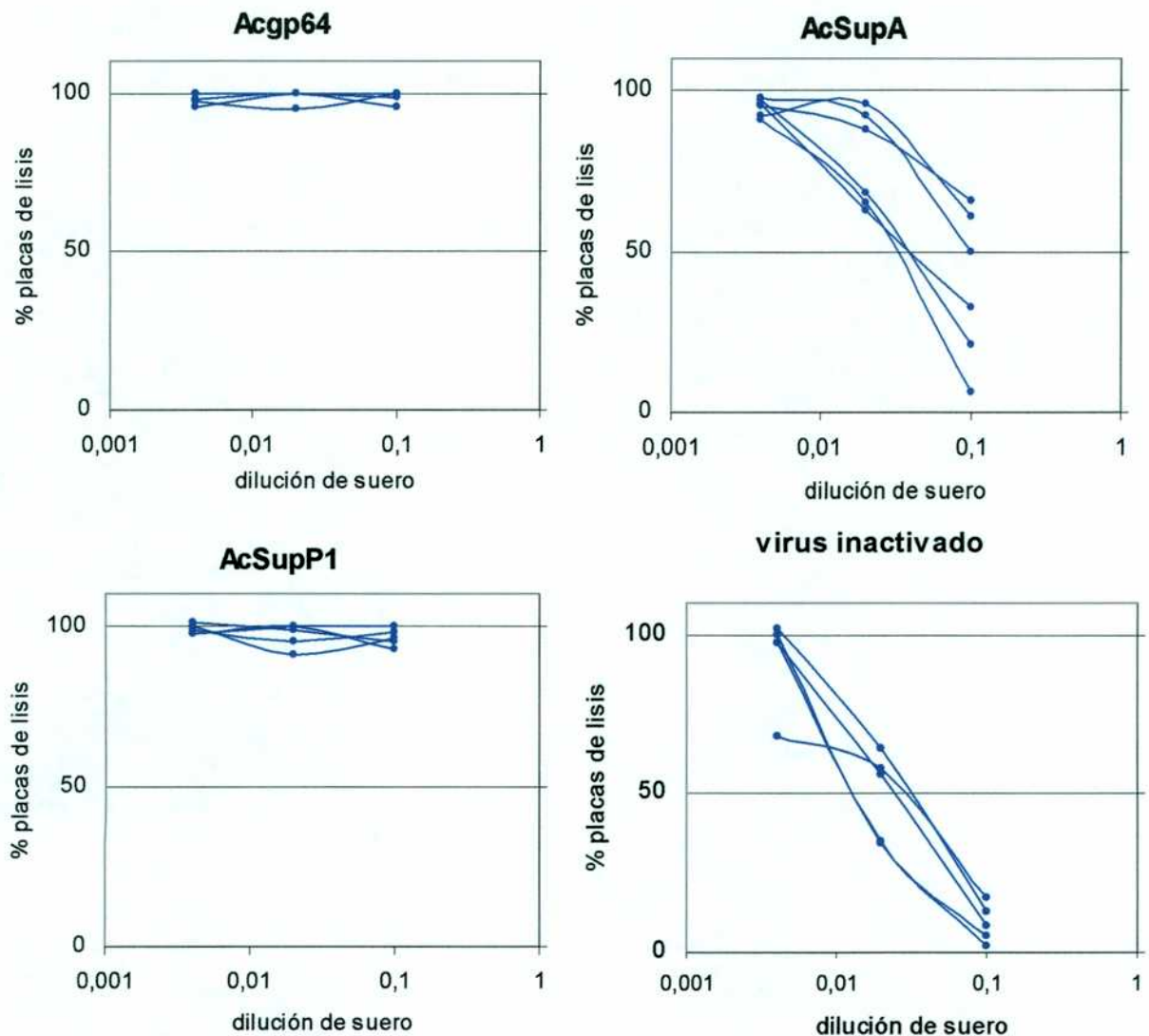


Figura 22.5. Ensayos de seroneutralización del VFA de ratones vacunados con baculovirus recombinantes formulados en PBS. Los sueros de animales vacunados se diluyeron en medio de cultivo y se midió entonces su capacidad neutralizante por ensayos de neutralización de la infectividad de VFA en células BHK. Los gráficos muestran la reducción en el número de placas de lisis de diluciones seriadas de los sueros de los animales vacunados. Cada curva corresponde a un animal individual.

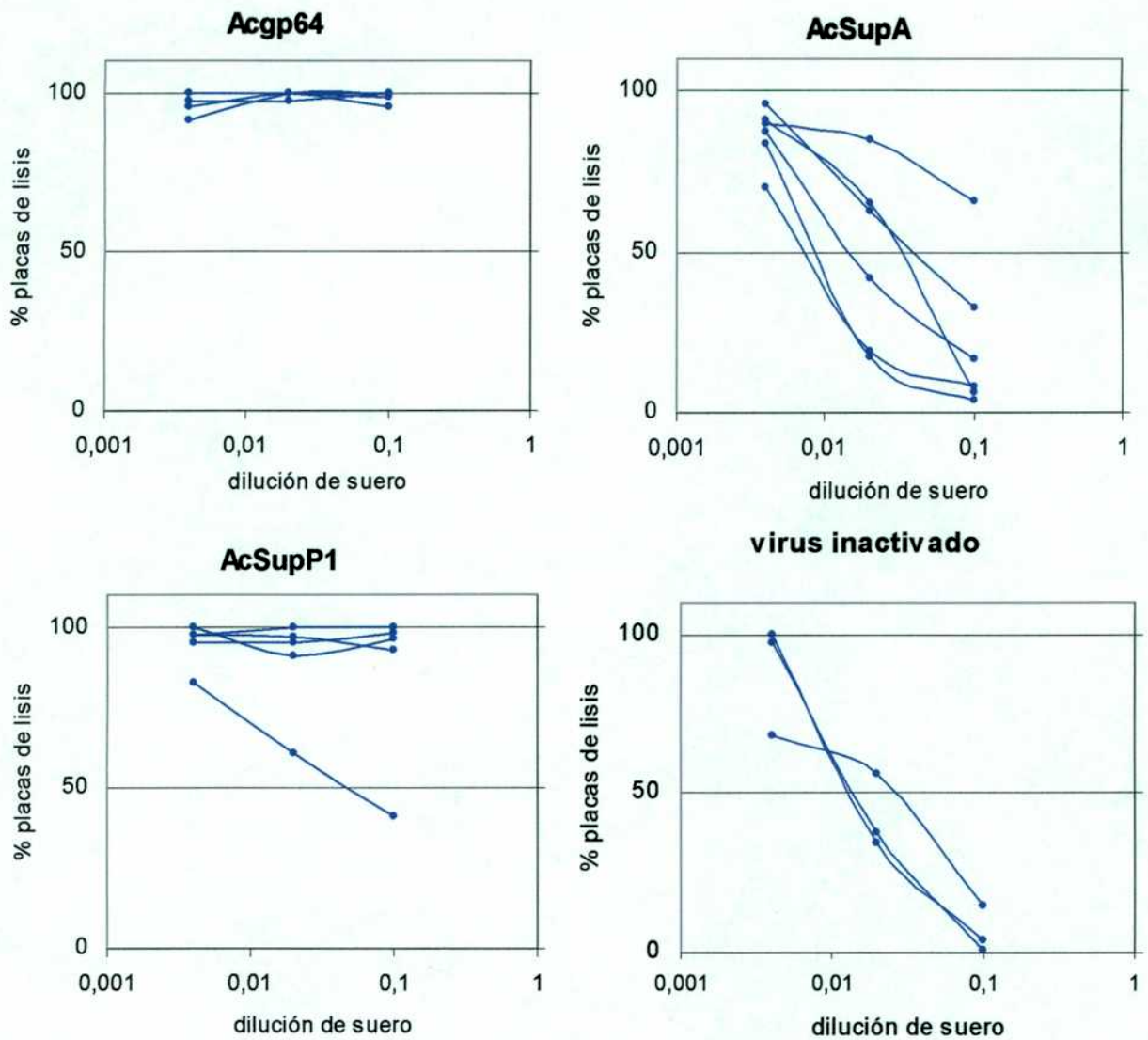


Figura 22.6. Ensayos de seroneutralización del VFA de ratones vacunados con baculovirus recombinantes formulados en adyuvante incompleto. Los sueros de animales vacunados se diluyeron en medio de cultivo y se midió entonces su capacidad neutralizante por ensayos de neutralización de la infectividad de VFA en células BHK. Los gráficos muestran la reducción en el número de placas de lisis de diluciones seriadas de los sueros de los animales vacunados. Cada curva corresponde a un animal individual.

Los títulos seroneutralizantes de cada animal, determinados como la inversa de la dilución capaz de neutralizar el 50% de las 100 unidades formadoras de placa, se resumen en la tabla 22.2.

Grupo experimental	Antígeno vacunal	Animales con título >1	Título seroneutralizante promedio de los animales con título >1
1	Acgp64/PBS	0/4	<1
2	Aggp64/ady	0/4	<1
3	AcSupA/PBS	4/6	1,1
4	AcSupA/ady	5/6	1,71
5	AcSupP1/PBS	0/6	<1
6	AcSupP1/ady	1/6	1,5
7	VFA/PBS	5/5	1,71
8	VFA/ady	3/3	1,79

Tabla 22.2. Títulos seroneutralizantes de los ratones vacunados con baculovirus recombinantes. Para cada animal desafiado se calcularon los títulos seroneutralizantes como la inversa del \log_{10} de la dilución de suero que redujo el número de placas de lisis al 50%. La tabla muestra el número de animales de cada grupo con índices superiores a 1 y su título promedio.

Los resultados de los experimentos de seroneutralización mostraron que las vacunas formuladas con el baculovirus recombinante AcSupA fueron capaces de despertar en ratones una respuesta humoral neutralizante, aún en ausencia de adyuvante incompleto. La formulación en adyuvante incompleto de Freund aumentó el título seroneutralizante promedio y la cantidad de animales del grupo con títulos mayores a 1. Ambas vacunas, sin embargo, tuvieron títulos menores a los obtenidos con las vacunas formuladas en base a VFA inactivado.

Por otro lado, las vacunas formuladas en base al baculovirus AcSupP1 despertaron una muy pobre respuesta neutralizante: sólo un animal tuvo un título mayor a 1. Como se esperaba, los animales vacunados con el baculovirus control Acgp64 no neutralizaron *in vitro* al VFA, demostrando la especificidad de la respuesta de los animales vacunados con AcSupA.

VI. Discusión

El desarrollo de vacunas no convencionales contra patógenos de interés veterinario estuvo basado en gran medida en el reconocimiento y la utilización de sitios antigénicos derivados de proteínas involucradas en la respuesta inmune protectora. Estos antígenos recombinantes, ya sea solos o formando parte de proteínas de fusión, producidos de manera monomérica y en una forma soluble, resultaron en general pobres inmunógenos comparados con los mismos antígenos presentados por virus o bacterias en vacunas inactivadas o atenuadas (Taboga & Tami 1997, Ghiasi *et al.* 1992, Baldwin *et al.*, 1998). De hecho, a menudo se requiere de la combinación de tales subunidades proteicas recombinantes con potentes adyuvantes para lograr despertar respuestas inmunes razonables contra el antígeno presentado. Para aumentar estas respuestas se recurrió en algunos casos al empleo de virus vectores tales como vaccinia, adenovirus y herpesvirus (Dittmer *et al.*, 1999, Elahi *et al.*, 1999 Willemse *et al.* 1996) y a bacterias como *Salmonella*, *Escherichia coli* o BCG (Wang *et al.* 1999 Honda *et al.*, 1995) para su empleo como vectores vivos replicantes para la presentación al sistema inmune de antígenos protectores patógenos de interés. Aunque este enfoque es atractivo para lograr simplificar esquemas de vacunación y aumentar la inmunogenicidad de antígenos solubles, los riesgos relacionados con el uso de esta clase de vacunas basadas en el uso de vectores vivos y la pobre confianza en los procesos de atenuación pueden atentar contra la aprobación de este tipo de vacunas, particularmente en poblaciones inmunocomprometidas.

Aunque se dispone en la actualidad de vacunas inactivadas efectivas contra la fiebre aftosa, los riesgos asociados a la manipulación de grandes masas virales y a la inactivación incompleta impulsaron la búsqueda de vacunas alternativas. En el desarrollo de estas vacunas alternativas se reconocieron una serie de antígenos simples y complejos capaces de desarrollar una respuesta inmune protectora al ser utilizados como vacunas a subunidades (Bittle *et al.*, 1982). Como se mencionó anteriormente, el sitio antigénico A comprendido entre los aminoácidos 138 y 156 de la proteína estructural VP1 del VFA (Strohmaier *et al.*, 1982) mostró una particular capacidad de inducir una respuesta inmune protectora contra el desafío viral. Existen muchos antecedentes de vacunación de diferentes especies con péptidos sintéticos derivados del VFA, principalmente imitando la región 140-160 de la proteína VP1. Si bien estos ejemplos muestran que es posible obtener

protección frente al desafío con VFA (DiMarchi *et al.*, 1986; Bittle *et al.*, 1982; Zamorano *et al.*, 1995), se requirieron grandes cantidades de inmunógeno o el uso de fuertes inmunomoduladores, como adyuvante completo de Freund para despertar una respuesta inmune protectora (DiMarchi *et al.*, 1986). Además, para el caso concreto de vacunas peptídicas para el VFA de serotipo C3 en el hospedador natural, se demostró que la vacunación con péptidos sintéticos despertó una escasa respuesta protectora, y debido a escape inmunológico fue posible rescatar virus con mutaciones en el sitio antigénico A de las lesiones de algunos animales que no resultaron protegidos (Taboga & Tami, 1997).

La proteína VP1 pudo expresarse exitosamente en *Escherichia coli* (Kleid *et al.*, 1981) y el sitio A se utilizó formando parte de una serie de proteínas de fusión, como, por ejemplo, con el extremo amino terminal del antígeno core del VHB (Clarke *et al.*, 1987). Por otro lado, se expresó en el sistema baculovirus la poliproteína P1 precursora de las proteínas estructurales del VFA y sorpresivamente se identificaron en esta poliproteína epitopes conformacionales presentes en la partícula viral madura (Sáiz *et al.*, 1994). Con esta construcción se obtuvieron niveles de protección en cerdos del orden del 50% (Grubman *et al.*, 1993). Todos estos diferentes intentos trataron de superar los inconvenientes planteados por las vacunas tradicionales a virus inactivado respecto de la manipulación de grandes masas virales y los riesgos relacionados con su inactivación química, tratando de proporcionar respuestas inmunes semejantes a las obtenidas por las vacunas tradicionales.

En este sentido, este trabajo de tesis tuvo como objetivo diseñar racionalmente vacunas contra la fiebre aftosa mediante la expresión de sitios antigénicos simples y antígenos complejos derivados del virus de la fiebre aftosa del serotipo C3 en diferentes sistemas de expresión. Para ello se intentó la expresión de las proteínas recombinantes core-sitio A, P1Mir y P1Mir-2A en bacterias, levaduras y células de insecto y la construcción de baculovirus recombinantes llevando en su superficie sitios antigénicos del VFA fusionados a la glicoproteína gp64.

1. Expresión de sitios antigénicos derivados del VFA en *E. coli* y levaduras

Debido a su sencillez y su bajo costo, la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* suele ser el primer objetivo en el desarrollo de un sistema de obtención de una proteína de interés. En nuestro laboratorio existía el antecedente de que la secuencia codificante para la fusión *core*-sitio A no había podido ser clonada en la orientación correcta en el plásmido pKK 2332, indicando su posible toxicidad. Para aumentar los niveles de represión de una posible expresión basal, se clonaron las secuencias codificantes para dicha fusión y para la poliproteína P1 en vectores con el promotor regulable T7. De esta manera fue posible obtener bacterias transformantes con las secuencias clonadas en su orientación correcta. Sin embargo, cuando se transformaron bacterias *E. coli* de la cepa BL21 (que llevan el gen de la enzima T7 ARN polimerasa) con un plásmido recombinante codificante para la fusión *core*-sitio A no fue posible obtener la proteína de fusión a niveles detectables por *Western-blot*. Esta imposibilidad parece atribuible a la expresión de la secuencia del sitio A del serotipo C3Arg85 en la porción aminoterminal del antígeno *core*, dado que construcciones similares de la secuencia *core* solamente o fusiones a partir de otros epitopes (incluidas secuencias derivadas del VFA, ver Tabla 2 en Introducción) fueron expresadas por otros investigadores. Más aún, Chambers y colaboradores (1996) expresaron a altos niveles un epitope similar al sitio A del serotipo C3 insertado en el *loop* del antígeno *core* en *E. coli*, obteniendo su multimerización en partículas semejantes a virus.

Por otro lado, pudo expresarse en nuestro laboratorio la poliproteína precursora P1 fusionada a una cola de polihistidinas en este sistema. Sin embargo, no pudo obtenerse esta proteína empleando métodos de extracción no desnaturizantes. Empleando soluciones conteniendo urea 6M, esta proteína recombinante pudo obtenerse y purificarse por columnas de níquel. Los niveles de producción fueron altos, del orden de 1 µg de proteína purificada por cada ml de cultivo bacteriano inducido. Sin embargo, esta versión desnaturizada no recuperó una conformación espacial que permitiera el reconocimiento de algún epitope conformacional presente en el virión maduro, como lo revelaron experimentos de *dot blot* con anticuerpos monoclonales conformacionales (datos no mostrados).

Cuando se inocularon ratones con la proteína recombinante P1 obtenida en este sistema, purificada y formulada en adyuvante oleoso (aproximadamente 100 µg), los sueros de los animales vacunados no mostraron una respuesta inmune humoral específica contra el VFA detectable por ensayos de ELISA de captura. Además, los experimentos de desafío de ratones lactantes mostraron la ausencia de una respuesta inmune protectora (datos no mostrados). Estos resultados contrastan con los obtenidos en experimentos de vacunación con la proteína VP1 expresada en *E. coli*, en los que cantidades equivalentes de esta proteína despertaron respuestas inmunes protectoras (Kleid et al., 1982). Debido a que la secuencia de VP1 forma parte de la poliproteína P1 (corresponde a aproximadamente el 25% de su secuencia), los resultados sugieren que no sólo P1 adopta una conformación espacial que no repite los epitopes conformacionales del virión, sino que además su conformación parece ocultar los epitopes inmunodominantes (ubicados principalmente en el sitio A de la proteína VP1) para despertar una respuesta humoral adecuada.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la expresión adecuada de proteínas de interés en este sistema bacteriano es fuertemente dependiente de su secuencia, e indican que no siempre los altos niveles de producción y purificación son las propiedades más importantes de un sistema de expresión heterólogo. De hecho, cobran importancia los efectos que sobre la proteína tienen los métodos de extracción, el procesamiento de la proteína *in vivo* y el grado en que los altos niveles de expresión, inapropiadas modificaciones post-traduccionales o incorrectos plegamientos espaciales pueden tener en su solubilidad.

Los sistemas de expresión de proteínas basados en levaduras fueron utilizados para la expresión de una gran variedad de proteínas de origen bacteriano y viral. Debido a la simplicidad y al reducido costo de los medios de cultivo empleados, las levaduras resultan una alternativa atractiva a los sistemas procarióticos. De hecho, se desarrollaron *kits* comerciales para la construcción de levaduras recombinantes que utilizan distintas cepas derivadas del organismo *Pichia pastoris*. En el caso particular de proteínas derivadas del VFA, Beasley y colaboradores (1990) expresaron con éxito una proteína *core* quimérica constituida por el sitio antigénico A derivado del VFA serotipo O insertado en el extremo aminoterminal de la

proteína *core* del VHB. Cuando se vacunaron cobayos con bajas dosis de esta proteína recombinante, se obtuvieron respuestas inmunes que protegieron los animales del desafío con virus homólogo.

Por otro lado, la falta de una conformación espacial adecuada en la proteína precursora P1 expresada en *E. coli* tiene una posible explicación en la falta de miristilación de esta proteína. Esta modificación post-traducciona contribuye a la estabilización de los pentámeros precursores de las cápsides virales (Moscufo *et al.*, 1991) y también sirve como sitio de anclaje para mantener altas concentraciones de estructuras subvirales (protómeros y pentámeros) en los sitios de la membrana donde probablemente ocurre la morfogénesis (Belsham, 1993). Se postuló también que la presencia de miristato podría afectar el plegamiento espacial del precursor P1-2A recombinante.

Debido a que este sistema eucariótico es capaz de efectuar esta modificación, la expresión del precursor P1 miristilado podría presentar importantes diferencias en sus características inmunológicas respecto de su contraparte procariótica.

Sin embargo, a pesar de los pronósticos y antecedentes de expresión de proteínas de fusión con la proteína *core* semejantes en este sistema, en nuestro laboratorio no fue posible expresar a niveles detectables por *Western blot* la proteínas recombinante P1 y la proteína quimérica *core*-sitio A (datos no mostrados). El hecho de que sólo pudieron expresarse niveles detectables de la proteína *core* y a que se expresaron con éxito fusiones similares con secuencias provenientes de otros serotipos parece indicar que la fusión al sitio A derivado del serotipo C3Arg85 fue responsable de la posible toxicidad de la proteína quimérica *core*-sitio A, un hecho similar al observado en la expresión de la misma proteína en bacterias.

2. Expresión de sitios antigénicos derivados del VFA en el sistema baculovirus-células de insecto

Como se mencionó anteriormente, este sistema posee algunas características que lo convirtieron en uno de los sistemas de expresión más ampliamente usado para el desarrollo de vacunas a subunidades. Entre otras, podemos recordar su capacidad de expresar proteínas potencialmente tóxicas, los muy altos niveles de

expresión de proteínas heterólogas (debidas a que la expresión esta regulada por un fuerte promotor viral muy tardío, activado cuando las células infectadas entraron en un período de *shut-off* de sus proteínas), la sencillez cada vez mayor de los *kits* comerciales para su manipulación y la inocuidad de los baculovirus para plantas y vertebrados.

Particularmente, la proteína *core* del VHB fue expresada a muy altos niveles empleando este sistema (Takehara *et al.*, 1988), rindiendo aproximadamente el 40% de las proteínas de células infectadas. Esta proteína recombinante se ensambló, además, en partículas *core* de 27 nm semejantes a las observadas en infecciones naturales. Por otro lado, fue posible expresar con éxito la proteína P1-2A precursora de las proteínas estructurales del VFA (Sáiz *et al.*, 1994). Esta proteína alcanzó niveles de entre el 2 y 5% de las proteínas totales de células infectadas.

Utilizando este sistema eucariótico fue posible expresar con éxito la proteína *core*, la proteína quimérica *core-A* y los polipéptidos precursores P1 y P1-2A. Estas proteínas recombinantes pudieron extraerse empleando métodos no desnaturizantes, y los niveles de expresión alcanzados fueron del orden del 10% para las proteínas *core* y *core-A* y del orden del 1% o menores para las proteínas P1 y P1-2A. Estas proteínas mostraron el peso molecular esperado, y reaccionaron con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el sitio antigénico A del VFA serotipo C3 y con anticuerpos policlonales contra el antígeno *core* del VHB, demostrando en el caso de la proteína *core-A* su naturaleza quimérica.

La proteína *core* extraída mediante el *buffer* no desnaturizante NP40 mostró en experimentos de ultracentrifugación a través de gradientes de sacarosa un comportamiento compatible con una estructura particulada, sedimentando en las fracciones medias del gradiente. Esta naturaleza multimérica no se vio afectada por este método de extracción. Estos resultados concuerdan con los existentes en la literatura para secuencias similares expresadas en este y otros sistemas de expresión. Sin embargo, aunque fue posible expresar la proteína quimérica *core-A*, esta proteína pudo extraerse sólo en la forma de monómeros u oligómeros, ya que no fue posible separarla del resto de las proteínas presentes en extractos de células infectadas mediante ultracentrifugación en gradientes de sacarosa. Estos resultados contrastan nítidamente con los obtenidos por otros grupos de

investigación empleando construcciones similares derivadas de otros microorganismos, incluyendo secuencias del VFA de otros serotipos (Beesley *et al.*, 1990). Las similitudes en el lugar de inserción en la proteína *carrier* (el extremo aminoterminal), así como en las secuencias río abajo de la secuencia del sitio A del serotipo C3Arg85, sugieren que es esta última la responsable de la alteración en la estructura espacial de la proteína *core* que, o bien dificulta su interacción con otras moléculas para dar formación a las partículas *core-A* o inestabiliza las posibles estructuras particuladas.

La observación de que la desnaturalización deliberada de quimeras resulta en una considerable (aunque no total) pérdida de inmunogenicidad de péptidos poco inmunogénicos por sí solos (Francis *et al.*, 1989) sugiere que la respuesta inmune, además del componente basado en la actividad estimuladora de células T colaboradoras de la proteína *core*, posee un fuerte componente basado en la naturaleza particulada del antígeno. Debido a que la quimera *core-A* carece de esta última característica, se buscaron alternativas en su proceso de síntesis para otorgar esta naturaleza particulada antes de ensayar sus propiedades inmunogénicas. Para permitir la formación de partículas *core-A* o aumentar la estabilidad de multímeros conteniendo el sitio antigénico de interés, se ensayó la formación de heteromultímeros por coexpresión en células de insecto de las proteínas recombinantes *core* y *core-A*. Mediante coinfecciones de baculovirus recombinantes para las secuencias *core* y *core-A* y posterior extracción de las células coinfectadas con el *buffer* NP40 fue posible obtener partículas mixtas *core:core-A* que tuvieron un comportamiento de sedimentación en gradientes de sacarosa semejante al de las partículas *core*. Los mejores resultados (en términos de mayor incorporación del sitio antigénico A) se obtuvieron empleando la relación de coinfección *core:core-A* de 2:1. Esta relación de 2:1 se mantuvo también en la proporción de moléculas *core* a *core-A* en las partículas mixtas (Figura 9.2). Los ensayos de ELISA realizados, en los que las partículas mixtas *core:core-A* fueron capturadas por anticuerpos anti *core* y reveladas con anticuerpos monoclonales anti VFA, demostraron que los epitopes presentes en el sitio antigénico A estuvieron accesibles a los anticuerpos, evidenciando una correcta localización en la superficie de las partículas (Figura 9.3).

A pesar de haberse logrado la particulación de moléculas llevando el sitio antigénico A con una adecuada localización en la superficie de las mismas, los experimentos de vacunación mostraron que, a las dosis ensayadas, estas partículas mixtas fueron incapaces de despertar una respuesta inmune detectable en ratón mediante ensayos de ELISA ni de conferir protección frente al desafío con virus homólogo. Esta incapacidad puede deberse a las bajas concentraciones de epitopes derivados del VFA en las preparaciones inoculadas, puesto que las máximas concentraciones que pudieron alcanzarse para incluirse en las formulaciones nunca superaron los 0,5 μg de proteína quimérica *core-A* (equivalentes a aproximadamente 0,05 μg de sitio A) por ratón. Sin embargo, Clarke y colaboradores (1987) mostraron que empleando cantidades aún menores de una proteína quimérica muy semejante (del orden de los 0,2 μg), era posible despertar una respuesta inmune anamnésica en cobayos mediante dos inmunizaciones. Estos resultados disímiles pueden deberse, de todas maneras, a que el péptido derivado del VFA utilizado por Clarke era derivado del serotipo O1 Kaufbeuren, y ambas secuencias, aunque de longitud similar y semejante localización en las partículas *core*, pueden tener diferente inmunogenicidad. Otra posible explicación a la ausencia de inmunogenicidad de las partículas mixtas *core/core-A* puede estar dada por el hecho de que en la superficie de éstas la densidad de epitopes derivados del VFA es inferior a la que puede obtenerse en partículas homogéneamente recombinantes. Los estudios detallados acerca de los mecanismos de la respuesta inmune contra el antígeno *core* del VHB (Milich *et al.*, 1988) revelaron que estas partículas son capaces de inducir tanto respuestas inmunes dependientes de células T como independientes. Como se mencionó anteriormente, la respuesta de tipo T dependiente refleja la presencia de secuencias estimuladoras potentes de células T en la proteína (Clarke *et al.*, 1990). Inversamente, la naturaleza T independiente de la respuesta inmune parece ser debida a la naturaleza repetitiva de los epitopes para células B en la superficie de la partícula. Los experimentos de inmunogenicidad de fusiones entre la proteína *core* y epitopes derivados de rinovirus humano (Clarke *et al.*, 1990) demostraron que cuando esta proteína se inoculó en cobayos de manera desnaturalizada, la respuesta humoral fue una cien veces menor que al inocularlo de forma nativa,

mostrando la importancia de su naturaleza particulada. Si la densidad de epitopes derivados del VFA en las partículas mixtas descritas en esta tesis implicara que la distancia entre éstos fuera menor a la necesaria para que se pudieran estimular adecuadamente linfocitos B con inmunoglobulinas de superficie específicas contra estos epitopes del VFA, la respuesta inmune se asemejaría más a la de una proteína de fusión soluble, requiriéndose una dosis mucho mayor de inmunógeno para despertar la misma respuesta.

Como se mencionó anteriormente, Sáiz y colaboradores mostraron que el precursor no procesado P1-2A derivado del VFA presenta epitopes discontinuos involucrados en los mecanismos de neutralización viral. Mediante ensayos de *dot blot* con esta proteína recombinante, observaron que el patrón de reactividad con anticuerpos monoclonales que reconocen un sitio antigénico complejo (denominado sitio D) era muy similar al del virus entero, cualitativa y cuantitativamente. Este sitio antigénico complejo involucra el *loop* B-C de VP2 (residuos 70 a 80), el *knob* B-B de VP3 (residuos 58 a 61) y el residuo 193 en el extremo carboxiterminal de VP1 en los virus del serotipo C (Lea *et al.*, 1992). Siguiendo parámetros muy similares a los utilizados por este grupo (que incluyen la incorporación de secuencias de miristilación, cuya importancia se discutió anteriormente), se consiguió expresar en células de insecto y extraer mediante métodos no desnaturalizantes las poliproteínas precursoras P1 y P1-2A. Cuando se enfrentaron estas poliproteínas precursoras con anticuerpos monoclonales que reconocen epitopes secuenciales o discontinuos en la partícula viral, sólo se encontraron semejanzas en la reactividad a nivel de epitopes secuenciales. Estas diferencias de resultados no pueden atribuirse a la ausencia de la secuencia codificante para el polipéptido 2A ni a la ausencia del sitio de miristilación, como en el caso de Grubman y colaboradores (1993). Los resultados obtenidos sugieren que las diferencias en la secuencia aminoacídica de la poliproteína P1 del VFA C3Arg85 respecto de la derivada del VFA serotipo CS8 utilizada por Sáiz y colaboradores pueden ser responsables de la falta de plegamiento adecuada de la primera, reflejada en la ausencia de reactividad con el panel de anticuerpos monoclonales discontinuos (datos no mostrados).

A pesar de estos resultados, esta proteína fue empleada para inmunizar ratones y evaluar su inmunogenicidad. En nuestras condiciones de trabajo, la vacunación

con extractos proteicos derivados de células de insecto conteniendo estas poliproteínas a la máxima concentración posible (aproximadamente 50 µg por animal) despertó en ratones una respuesta inmune humoral baja y heterogénea medible por ensayos de ELISA y una escasa protección frente al desafío con VFA. Esta baja respuesta podría deberse tanto a un incorrecto plegamiento tridimensional como a la baja concentración inoculada. Sin embargo, la vacunación con la versión producida en bacterias de la proteína P1, con la que fue posible formular vacunas de altas concentraciones y buenos niveles de purificación, tampoco despertó en ratones una respuesta inmune humoral medible por tests de ELISA de captura ni fue suficiente para conferir protección frente al desafío con VFA (Figura 11 y Tabla 11). Estos resultados sugieren que la ausencia de respuesta conferida por la vacunación con la versión eucariótica de P1 puede deberse menos probablemente a su concentración que a un incorrecto plegamiento espacial.

3. Expresión de sitios antigénicos derivados del VFA en la superficie de baculovirus y en la membrana de células de insecto infectadas

Debido a la baja inmunogenicidad de los diferentes antígenos derivados del VFA expresados como proteínas solubles, se intentó la expresión de sitios antigénicos simples y complejos en una diferente localización celular. Por un lado, los antecedentes exitosos de vacunación con células infectadas por baculovirus recombinantes codificantes para proteínas derivadas de patógenos de interés se basaron exclusivamente en la expresión de glicoproteínas derivadas de virus con envoltura. Por otro lado, Boublik y colaboradores (1995) describieron un método alternativo al método denominado *phage display*; estos métodos basan su estrategia en la expresión de secuencias de interés a ser seleccionadas entre una vasta población de secuencias similares como fusiones a proteínas de superficie, tanto de bacteriófagos como de baculovirus. En base a estos antecedentes, se construyó un vector de transferencia en el que se insertó una corta secuencia múltiple de clonado entre la secuencia señal y la secuencia madura de la glicoproteína gp64 del virus de la poliedrosis nuclear *Autographa californica*. Esta glicoproteína forma parte integral de la membrana de los baculovirus extracelulares

(no ocluidos) asociándose a otras moléculas idénticas, probablemente como tetrámeros. En este vector de transferencia se clonaron las secuencias codificantes para el sitio A y para la poliproteína precursora P1 y con los vectores recombinantes se construyeron baculovirus por los métodos ya descritos. Los experimentos de *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A o anti gp64 para ensayar la expresión de las proteínas de fusión con gp64 mostraron que fue posible expresar ambas fusiones en este sistema, aunque los niveles de expresión de la fusión sitio A-gp64 fueron aproximadamente un orden de magnitud más altos que los de la fusión P1-gp64 (Figura 18.1). Mediante ensayos de inmunofluorescencia se demostró no sólo la localización de las secuencias foráneas en la membrana de células infectadas con los baculovirus recombinantes sino también su accesibilidad a los anticuerpos monoclonales (Figura 19).

Cuando se analizaron mediante *Western blot* los sobrenadantes de las células infectadas con los baculovirus recombinantes para las fusiones VFA-gp64, se demostró la asociación de las proteínas quiméricas a los baculovirus (Figura 18.2). Este hecho fue confirmado mediante experimentos de sedimentación en gradientes de sacarosa, en los que los picos de infectividad y reactividad con anticuerpos monoclonales fueron coincidentes (Figura 20.1). Para el caso particular de la fusión sitio A-gp64, se observó en experimentos de *Western blot* con anticuerpos monoclonales anti sitio A o anti gp64 la presencia de una banda de peso molecular compatible con la formación de homodímeros o heterodímeros. La comparación de las reactividades relativas de las fusiones VFA-gp64 en extractos celulares y en sobrenadantes de células infectadas sugiere que el baculovirus AcSupA es capaz de incorporar más proteína recombinante que el baculovirus AcSupP1 a medida que brota de la superficie celular. Además, es importante destacar que la incorporación de estas proteínas quiméricas a la superficie de los baculovirus recombinantes no alteró su capacidad de replicación a medir por los títulos obtenidos en los diferentes *stocks* de trabajo.

Mediante experimentos de competencia con virus aftoso por un panel de anticuerpos monoclonales secuenciales y conformacionales se ensayaron las propiedades antigénicas de los baculovirus recombinantes AcSupA y AcSupP1. Los resultados mostraron que las secuencias derivadas del VFA presentes en la superficie de los baculovirus están bien expuestas al solvente (y por lo tanto, al

sistema inmune), dado que fueron capaces de competir eficientemente con el VFA por la unión a los distintos anticuerpos monoclonales secuenciales. En términos generales, el baculovirus AcSupA compitió más eficientemente que AcSupP1 por los diferentes anticuerpos monoclonales ya que el baculovirus AcSupP1 sólo compitió más eficientemente que AcSupA por el monoclonal 7AH1. La mayor densidad de epitopes presentes en la superficie de los baculovirus AcSupA podría explicar en parte los resultados obtenidos con los anticuerpos monoclonales secuenciales 7FC12, 7CA11, 7EE6 y 2LC9. Sin embargo, AcSupP1 compitió significativamente mejor por la unión al anticuerpo monoclonal secuencial 7CH1, sugiriendo que las diferentes secuencias que rodean el sitio A en los dos baculovirus recombinantes (gp64 en AcSupA y secuencias naturales del VFA en AcSupP1) pueden modificar su accesibilidad o reactividad.

Cuando se realizaron experimentos de competencia entre el baculovirus AcSupP1 y el VFA por la unión a diferentes anticuerpos monoclonales conformacionales dirigidos contra el sitio D, los resultados mostraron que la proteína quimérica gp64-P1 no adoptó una conformación espacial semejante a la del VFA entero. Estos resultados se contraponen a los descriptos por Saiz y colaboradores (1994). Debido a que esta ausencia de reactividad con anticuerpos monoclonales conformacionales se obtuvo también con las proteínas solubles P1 y P1-2A, las diferencias con los resultados de Saiz y colaboradores (1994) parecen deberse más a las diferencias entre las secuencias primarias entre las diferentes versiones de las proteínas precursoras más que a la fusión a la glicoproteína gp64.

4. Inmunogenicidad de los antígenos derivados del VFA expresados en la superficie de células infectadas

Como se describió anteriormente, la inmunogenicidad de sitios antigénicos puede ser aumentada mediante su acoplamiento a diferentes moléculas o estructuras transportadoras. Estas estructuras brindan epitopes para células T colaboradoras para la producción de anticuerpos por los linfocitos B y aumentan la masa molecular de sitios antigénicos pequeños, mejorando de este modo su captura por las células presentadoras de antígeno. Sin embargo, en algunos casos los péptidos o antígenos mayores pueden resultar inmunogénicos de por sí, debido a

la presencia de epitopes para células B y T dentro de la misma secuencia, y la molécula transportadora actúa simplemente como sistema monomérico o multimérico de presentación. Además, ésta puede actuar aumentando la masa del péptido, mejorando la captura del antígeno por parte de las células presentadoras. Un caso extremo de estructura transportadora de epitopes puede considerarse al de una célula presentando el antígeno de interés en su superficie. Existen ejemplos en los que diversas proteínas derivadas de diferentes patógenos despertaron respuestas inmunes protectoras cuando se vacunaron animales con células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes para estas proteínas de interés (Wardley *et al.*, 1992; Ghiasi *et al.*, 1996; Haanes *et al.*, 1997). Esta estrategia resulta interesante pues no emplea métodos de purificación de la proteína recombinante: las células de insecto infectadas son lavadas, formuladas adecuadamente e inoculadas en cantidades de entre 10^8 y 10^{10} células infectadas por animal. Sin embargo, los ejemplos de empleo con éxito de esta metodología se circunscriben a glicoproteínas de membrana derivadas de virus envueltos, y no existen antecedentes en la bibliografía de proteínas citoplasmáticas expresadas e inoculadas de esta manera.

Como se describió en el ítem anterior, las células infectadas con los baculovirus AcSupA y AcSupP1 presentan en su superficie proteínas de fusión entre sitios antigénicos derivados del VFA y la proteína gp64. Los antígenos heterólogos, insertados en el marco de una glicoproteína de membrana particularmente funcional en células de insecto, son transportados y anclados a la superficie de células Sf9 como una glicoproteína natural de membrana.

Cuando se vacunaron ratones por vía intraperitoneal con células infectadas con el baculovirus AcSupA, los niveles de anticuerpos medidos por ELISA de captura fueron muy similares a los niveles de anticuerpos derivados de animales vacunados con 1 μ g de virus aftoso inactivado. También fueron similares los niveles de anticuerpos medidos por ensayos de seroneutralización, hecho que demuestra la funcionalidad neutralizante de los anticuerpos despertados por este inmunógeno. Mediante ensayos de desafío con VFA se midió la capacidad protectora de esta clase de vacunas. El 100% de los animales desafiados resultó protegido frente al desafío con virus, aún en ausencia de cualquier adyuvante (las células estuvieron resuspendidas en *buffer* PBS). En un grupo de animales

desafiados aproximadamente 100 días después de haber recibido la última dosis de refuerzo, los niveles de protección alcanzaron al 83%, demostrando que la respuesta inducida fue de larga duración. Cabe destacar que estos resultados se obtuvieron empleando, en todos los casos, formulaciones acuosas (células resuspendidas en *buffer* PBS).

En el caso de ratones vacunados intraperitonealmente con células infectadas con el baculovirus recombinante AcSupP1, la respuesta humoral medida por ensayos de ELISA de captura fue menor a la obtenida con células infectadas con AcSupA. Sin embargo, cuando los ratones se vacunaron subcutáneamente con los inmunógenos formulados en adyuvante incompleto de Freund, los niveles de anticuerpos inducidos por las células infectadas con AcSupP1 fueron mayores a los de las células infectadas con AcSupA inoculados por la misma vía, indicando que la ruta óptima de inmunización puede depender de cada inmunógeno. A pesar de estos valores más elevados de densidad óptica en ensayos de ELISA, los niveles de anticuerpos neutralizantes fueron muy bajos, comparables a los inducidos por el control negativo (células infectadas por el baculovirus Acgp64). También fue baja la protección frente al desafío con virus infeccioso cuando los ratones se vacunaron subcutáneamente, tanto con células infectadas con el baculovirus AcSupP1 (3/6) como con el baculovirus AcSupA (3/6). Asimismo, cuando se desafiaron ratones vacunados intraperitonealmente con células infectadas con AcSupP1 con VFA infeccioso, los niveles de protección alcanzados fueron bajos (2/6). Esta baja protección puede ser debida, como en los casos anteriores, a la incorrecta conformación adoptada por la proteína P1 en el contexto de la glicoproteína gp64.

5. Inmunogenicidad de los antígenos derivados del VFA expresados en la superficie de baculovirus

Recientemente se ha desarrollado una gran variedad de sistemas basados en partículas semejantes a virus o virus quiméricos para la expresión de antígenos de interés. Se ha logrado exponer una amplia gama de secuencias peptídicas en la superficie de estructuras ampliamente organizadas como rinovirus, poliovirus,

bacteriófagos y virus vegetales (Ferstanding *et al.*, 1994, Almond *et al.*, 1990, Cwirla *et al.*, 1990, Usha *et al.*, 1993).

Los virus de plantas resultaron un modelo muy atractivo, principalmente por sus bajos costos de producción, y se han desarrollado un alto número de vectores virales para la expresión en superficie de sitios antigénicos de interés. Sin embargo, presentan principalmente las dificultades de estar basados en genomas a ARN, con altas tasas de mutación y su producción primaria requiere de transfección de ARN recombinante en plantas. Además, debido a la gran simplicidad de sus cápsides, resulta más dificultoso expresar proteínas que pequeños péptidos simples constituidos por unos pocos aminoácidos. Pequeñas disrupciones en sus estructuras resultan a menudo en una falla para producir infecciones sistémicas en las plantas infectadas (Porta *et al.*, 1994).

Por otro lado, la expresión de secuencias en la superficie de virus animales trae aparejada las desventajas ya mencionada relacionadas con la manipulación de patógenos.

En este sentido, los baculovirus son virus envueltos con genomas de ADN, que no resultan patógenos para plantas ni para vertebrados. En la membrana exterior poseen una glicoproteína, gp64, que forma tetrámeros y atraviesa la envoltura. Esta glicoproteína es esencial para la penetración de los baculovirus no ocluidos en las células de insecto. La ubicación repetida en la superficie del virión y el conocimiento de los posibles sitios de inserción que no afectan la síntesis, procesamiento y compartimentalización de esta glicoproteína permitieron la expresión en su extremo aminoterminal de proteínas de fusión con sitios antigénicos derivados del VFA. La expresión de antígenos de interés en la superficie de baculovirus facilita además su purificación a partir de cultivos celulares infectados respecto de la purificación de proteínas solubles.

La vacunación con los baculovirus recombinantes AcSupP1 no despertó en los animales inoculados una respuesta inmune detectable por ensayos de ELISA ni de seroneutralización. Este resultado coincide con los obtenidos con las diferentes versiones de las poliproteínas precursoras P1 y P1-2A, y puede deberse tanto a la escasa cantidad de proteína inoculada debido a su baja expresión (conteniendo un equivalente aproximado a 3 μ g de proteína P1) como a la incorrecta conformación

adoptada por esta proteína en el contexto de la glicoproteína gp64 (Figuras 22.4 y 22.5).

Sin embargo, cuando se vacunaron ratones con los baculovirus recombinantes AcSupA (las cantidades de proteína quimérica presente en la superficie de los baculovirus fueron de aproximadamente 1 μ g), se obtuvo una respuesta humoral medible por ensayos de ELISA de captura. Esta respuesta humoral fue mayor cuando las vacunas basadas en baculovirus se formularon con adyuvante incompleto de Freund. Sin embargo, los animales vacunados con los baculovirus AcSupA resuspendidos en *buffer* PBS también mostraron niveles detectables de anticuerpos por ELISA.

La capacidad neutralizante de los anticuerpos producidos por la vacunación con los baculovirus AcSupA se midió también por ensayos de neutralización de la infectividad viral. Cuando se analizaron los anticuerpos provenientes de sueros de ratones vacunados con estos baculovirus, 4 de los 6 ratones vacunados mostraron títulos seroneutralizantes mayores que 1, con un título promedio de 1,1. Esta respuesta neutralizante fue aún mayor cuando las vacunas se formularon en adyuvante incompleto. En este caso, 5 de los 6 animales vacunados mostraron títulos seroneutralizantes mayores que 1, con un título seroneutralizante promedio de 1,71 (ver tabla 22.2).

En el caso de la vacunación de ratones con células infectadas con el baculovirus recombinante AcSupA, se observó una correlación entre los títulos de anticuerpos neutralizantes y la protección frente al desafío con VFA. Esta correlación hace posible suponer que los niveles de anticuerpos neutralizantes despertados por la vacunación con los baculovirus recombinantes AcSupA pueden ser suficientes para proteger ratones frente al desafío viral.

6. Consideraciones finales

Aunque la gran cantidad de vacunas existentes han servido para controlar numerosas enfermedades, sus efectos no deseados han llevado a la búsqueda de vacunas alternativas de igual o mejor potencia contra tales enfermedades. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante abrió nuevas posibilidades para

manipular genomas microbianos y aumentar el potencial de las vacunas sustancialmente.

Existen varios requerimientos para el desarrollo de una vacuna efectiva. En primer lugar, las vacunas deben ser seguras. Cuando la situación sanitaria para una determinada enfermedad es tal que relativamente pocos animales están en riesgo de contraer la enfermedad (como el caso de la fiebre aftosa en nuestro país en la actualidad), los riesgos de producción o de virulencia, por menores que sean, son inaceptables. Segundo, la vacuna debe ser capaz de producir una inmunidad protectora en una elevada proporción de individuos, estimulando linfocitos tanto B como T. Tercero, su producción debe resultar económica, sobre todo cuando están destinadas a una vasta población. Finalmente, para algunos agentes infecciosos, la inmunidad protectora requiere de la preexistencia de anticuerpos séricos. Esto es particularmente necesario para el caso de microorganismos intracelulares como los virus, que infectan las células hospedadoras un corto período después de entrar en el organismo.

Para el caso especial de vacunas recombinantes, es necesario también tener conocimiento sobre los antígenos que confieren inmunidad protectora. En el caso del VFA, existe un conocimiento acabado acerca de los sitios antigénicos inmunodominantes involucrados en la neutralización viral. De esta manera, se seleccionaron para este trabajo el sitio antigénico A, el principal sitio antigénico de todos los serotipos virales, y la poliproteína P1, que contiene las cuatro proteínas estructurales del virus. Con estos antígenos simples y complejos se ensayaron diferentes sistemas de expresión, con el objeto de encontrar el sistema más adecuado que permitiera a cada inmunógeno adoptar las conformaciones adecuadas y a las mayores concentraciones. Así, se ensayaron métodos de presentación multimérica, sobre estructuras particuladas, con la capacidad de imitar la conformación de los epitopes continuos y discontinuos en la partícula viral natural.

Sin embargo, además de las consideraciones inmunológicas, un inmunógeno destinado a la formulación de vacunas debe también soportar imposiciones biotecnológicas: la posibilidad de expresar los productos recombinantes, la capacidad éstos de ensamblarse en estructuras más complejas, su correcta conformación espacial y la capacidad de cada sistema de alcanzar una masa

crítica de inmunógeno que permita formulaciones con concentraciones adecuadas de antígeno.

Por las razones discutidas anteriormente, los sistemas basados en bacterias y levaduras no permitieron la expresión de ninguno de los productos recombinantes. El sistema "baculovirus-células de insecto" pudo sobreponer la posible toxicidad observada en los sistemas ensayados anteriormente, pero los productos no adoptaron las conformaciones espaciales deseadas: las proteínas P1 y P1-2A no adquirieron conformaciones que presentaran epitopes discontinuos semejantes a los de la partícula viral y la fusión *core*-sitio A no formó estructuras multiméricas. Aunque esta última propiedad pudo lograrse coexpresando las proteínas *core* y *core*-sitio A, la densidad de epitopes derivados del VFA en estas partículas mixtas o la inadecuada concentración obtenida impidieron que esta formulación despertara una adecuada respuesta inmune en ratones.

De todos los productos recombinantes ensayados, los baculovirus AcSupA cumplieron todos los requisitos impuestos, pues expusieron en su superficie y en la de células de insecto infectadas la proteína de fusión de interés, que adoptó conformaciones que permitieron que el sitio A presentara la mayoría de sus epitopes de manera semejante a la de la partícula viral, y alcanzara concentraciones compatibles con formulaciones de vacunas que confirieron una respuesta inmune específica contra el VFA. Si bien la expresión de la proteína de fusión gp64-P1 no se expresó tan efectivamente ni alcanzó densidades tan altas como las de gp64-A, fue probablemente su inadecuado plegamiento espacial el principal inconveniente. De todas maneras, su expresión y correcta localización demuestran que es posible presentar en este sistema antígenos de mayor peso molecular que el sitio A, como por ejemplo la proteína VP1. Esta proteína tiene un tamaño intermedio y contiene, además del sitio A, otros sitios antigénicos.

En un futuro próximo se planea realizar experimentos de protección con los baculovirus recombinantes AcSupA, y trasladar además la metodología desarrollada a otros antígenos de interés veterinario.

Finalmente, debido a que es posible multiplicar baculovirus mediante la infección de larvas de mariposas, la multiplicación de estos baculovirus recombinantes en este sistema podría constituir un método de producción de inmunógenos sencillo y más económico que la producción de baculovirus en células en cultivo para su

utilización como vacuna recombinante contra el VFA u otros patógenos de interés veterinario.

VII. Conclusiones

CONCLUSIONES

1. No fue posible expresar la proteína de fusión *core*-sitio A en un sistema bacteriano. Esta imposibilidad parece atribuible a la secuencia del sitio A del serotipo C3Arg85, dado que construcciones similares de la secuencia *core* solamente o fusiones a partir de otros epitopes (incluyendo epitopes derivados del VFA serotipo O) fueron expresadas exitosamente por otros investigadores.
2. Pudo expresarse exitosamente la poliproteína precursora P1 fusionada a una cola de polihistidinas en un sistema bacteriano. Sin embargo, no pudo obtenerse esta proteína empleando métodos de extracción no desnaturalizantes.
3. Pudo extraerse exitosamente la poliproteína P1 empleando métodos desnaturalizantes y purificarse sencillamente por columnas de níquel. Sin embargo, esta versión desnaturalizada no recuperó una conformación espacial que permitiera el reconocimiento de algún epitope conformacional presente en el virión maduro. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Saiz y colaboradores.
4. No fue posible expresar la poliproteína P1 ni la proteína de fusión *core*-sitio A en el sistema de expresión eucariótico derivado de la levadura *Pichia pastoris*. Sólo se observaron niveles detectables de proteína *core*, por lo que su fusión al sitio A fue responsable de su posible toxicidad, dado que construcciones similares pero expresando secuencias derivadas de otros serotipos fueron expresadas exitosamente por otros investigadores.
5. El empleo del sistema de expresión eucariótico "baculovirus-celulas de insecto" permitió expresar las proteínas derivadas del VFA. Estas proteínas pudieron ser extraídas, aunque con diferentes niveles de eficiencia, mediante métodos no desnaturalizantes.
6. La expresión de la proteína *core* en este sistema permitió su mulimerización, que no se afectó por los métodos de extracción empleados.

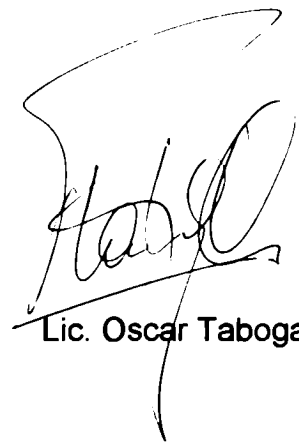
7. La expresión de la proteína de fusión *core*-sitio A en este sistema y su purificación mediante el detergente no iónico NP40 resultó en la obtención de monómeros u oligómeros. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Clarke y colaboradores en levaduras.
8. La coexpresión en la misma célula de insecto de las proteínas recombinantes *core* y *core*-sitio A permitió la incorporación de esta última a partículas mixtas. Estas tuvieron un comportamiento de sedimentación en gradientes de sacarosa semejante al de las partículas *core*.
9. La mayor incorporación de moléculas *core*-sitio A se obtuvo en coinfecciones con la proporción 2:1 de baculovirus AcNPVC y AcNPVCA, y rindió proporciones semejantes de las proteínas correspondientes en las partículas mixtas.
10. La vacunación con extractos proteicos derivados de células de insecto conteniendo estas partículas mixtas a la máxima concentración permitida por este sistema no despertó en ratones una respuesta inmune humoral detectable por ensayos de ELISA de captura ni fue suficiente para conferir protección frente al desafío con VFA. Estos resultados contrastan con los obtenidos por Clarke y colaboradores.
11. La vacunación con extractos proteicos derivados de células de insecto conteniendo la poliproteína P1 despertó en ratones una heterogénea respuesta inmune humoral detectable por ensayos de ELISA y una escasa protección frente al desafío con VFA. Esta baja respuesta puede deberse a un incorrecto plegamiento tridimensional o la baja concentración inoculada.
12. La vacunación con la versión producida en bacterias de la proteína P1, con la que fue posible formular vacunas de altas concentraciones y buenos niveles de purificación, no despertó en ratones una respuesta inmune humoral medible por tests de ELISA de captura ni fue suficiente para conferir protección frente al desafío con VFA. Estos resultados sugieren que la ausencia de respuesta conferida por la vacunación con la versión eucariótica de P1 puede deberse menos probablemente a su concentración que a un incorrecto plegamiento.

13. Se construyó un vector de transferencia universal para la generación de baculovirus recombinantes que expresan en su superficie o en la membrana de las células que infectan, fusiones entre la glicoproteína gp64 y diferentes secuencias derivadas del VFA. Se expresaron exitosamente estas proteínas en células de insecto y se comprobó su correcta localización celular y viral.
14. La incorporación de proteínas quiméricas VFA-gp64 a la superficie de los baculovirus recombinantes no alteró su capacidad de replicación a medir por los títulos obtenidos en los diferentes *stocks* de trabajo.
15. La proteína de fusión gp-sitioA alcanzó mayores niveles de expresión en células de insecto y en baculovirus que la fusión gp-P1.
16. Las secuencias derivadas del VFA presentes en la superficie de los baculovirus están expuestas al solvente, dado que fueron capaces de competir con el VFA por la unión a anticuerpos monoclonales específicos. El baculovirus AcSupA compitió mejor en términos generales que el baculovirus AcSupP1.
17. La vacunación con células de insecto infectadas con AcSupA (y en menor grado con AcSupP1) despertó una respuesta inmune humoral específica contra el VFA, aún en ausencia de adyuvantes. Esta respuesta fue comparable a la obtenida por vacunación con 1 μ g de VFA inactivado, tanto en ensayos de ELISAs de captura como de seroneutralizaciones. La vacunación con células de insecto infectadas con AcSupA protegió ratones contra la descarga con VFA, aún en ausencia de adyuvante, y aún 3 meses después de la aplicación del último refuerzo.
18. La vacunación con el baculovirus AcSupA despertó una respuesta inmune humoral específica contra el VFA, aún en ausencia de adyuvantes. La respuesta inmune conferida por vacunas formuladas con este baculovirus en presencia de adyuvante incompleto de Freund fue comparable a la obtenida por vacunación con 1 μ g de VFA inactivado, tanto en ensayos de ELISAs de captura como de seroneutralización.

19. Como conclusión general, además de las características antigénicas, un inmunógeno destinado a la formulación de vacunas debe también superar restricciones biotecnológicas como son: la posibilidad de expresar los productos recombinantes, la capacidad de éstos de ensamblarse en estructuras más complejas, su correcta exposición y conformación espacial y la capacidad de cada sistema de alcanzar una masa crítica de inmunógeno que permita formulaciones vacunales con concentraciones adecuadas de antígeno.



Dr. Eduardo Palma



Lic. Oscar Taboga

VIII. Bibliografía

Bibliografía

Abrams, C. C., King, A. M. Q. and Belsham, G. J. (1995). Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *Journal of General Virology* **76**: 3089-3098.

Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., and Brown, F. (1989). The three dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**: 709-716.

Adams, J. and McClintock, J. (1991). Nuclear polyhedrosis viruses of insects. *In* "Atlas of Invertebrate Viruses" (J. Adams & J. Bonami, Eds.), pp. 87-204. CRC Press, Boca Raton, Fl.

Adams, S. E., Burns, N. R., Layton, G. T., Kingsman, A. J. (1994). Hybrid Ty virus-like particles. *Int Rev Immunol*; **11**:133-41.

Almond, J. W. and Burke, K. L. (1990). Poliovirus as a vector for the presentation of foreign antigens. *Semin. Virol.* **1**: 11-20.

Argos, P. and Fuller, S. D. (1988). A model for the hepatitis B virus core protein: prediction of antigenic sites and relationship to RNA virus capsid proteins. *EMBO J.* **7**: 819-824.

Bachrach, H. (1977). Foot-and-mouth disease virus: properties, molecular biology and immunogenicity. *In*: Romberger, Betsville Symposia in Agricultural Research I. *Virology in Agriculture*, 3-32. Ed. Allanheld-Osmium, Montclair, N.Y.

Bahnemann, H. G. (1975). Binary ethylenimine as an inactivant for foot-and-mouth disease virus and its application for vaccine production. *Arch. Virol.* **47**: 47-56.

Baldwin, S., D'Souza, C., Roberts, A., Kelly, B., Frank, A., Lui, M., Ulmer, J., Huygen, K., McMurray, D., and Orme, I. (1998). Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infection and Immunity* **66**: 2951-2959.

Baltimore, D., Girard, M., and Darnell, J. E. (1966). Aspects of the synthesis of polyovirus RNA and the formation of virus particles. *Virology* **79**: 129.

Barbas, C. F. III, Kang, A. S., Lerner, R. A. and Benkovic, S. J. (1991). Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: The gene III site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 7978-7982.

Barnett, P. V., Ouldrige, E. J., Rowlands, D. J., Brown, F. And Parry, N. R. (1989) Neutralizing epitopes of type O foot-and-mouth disease virus. I. Identification and characterization of three functionally independent, conformational sites. *J. Gen. Virol.* **70**: 1483-1491.

Barteling, S. J. and Vreeswijk, J. (1991). Developments in foot-and-mouth disease vaccines. *Vaccine* **9**: 75-88.

Baxt, B., Vackharia, V. N., Moore, D. M., Franke, A. J. and Morgan, D. O. (1989). Analysis of neutralizing antigenic sites on the surface of type A12 foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **63**: 2143-2151.

Beck, E. & Strohmaier, K., (1987). Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J. Virol.* **61**: 1621-1629.

Beasley, K. M., Francis, M. J., Clarke, B. E., Beasley, J. E., Dopping-Hepenstal, P. J. C., Clare, J. J., Brown, F. & Romanos, M. A. (1990). Expression in yeast of amino-terminal peptide fusions to hepatitis B core antigen and their immunological properties. *Biotechnology* **8**: 644-651.

Belsham, G. J., and Brangwyn, J. K. (1990). A region of the 5' non-coding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein

synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control. *J. Virol.* **65**: 5828-5838.

Belsham, G. J. (1992). Dual initiation sites of protein synthesis on foot-and-mouth disease virus RNA are selected following internal entry and scanning of ribosomes in vivo. *EMBO J.* **11**: 1105-1110.

Birnboim, H., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening of recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.

Bittle, J. L., Houghten, R. A., Alexander, H., Shinnick, T. M., Sutcliffe, J. G., Lener, R. A., Rowlands, D. J., and Brown, F. (1982). Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature (London)* **298**: 30-33.

Blissard, G. and Rohrmann, G. (1989). Location, sequence, transcriptional mapping, and temporal expression of the gp64 envelope glycoprotein gene of the *Oryza pseudotsugata* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Virol.* **170**: 537-555.

Boothroyd, J. C., Harris, T. J. R., Rowlands, D. and Lowe, P. A. (1989). The nucleotide sequence of cDNA coding for the structural proteins of foot-and-mouth disease virus. *Gene* **17**: 153-161.

Borca, M., Fernández, F., Sadir, A. M. and Schudel, A. (1984) Reconstitution of immunosuppressed mice with mononuclear cells from donors sensitized to foot-and-mouth disease virus (FMDV). *Vet. Microbiol.* **10**: 1-11.

Borca, M., Fernández, F., Sadir, A. M., Braun, M. and Schudel, A. (1986) Immune response to foot-and-mouth disease virus in a murine model: effective tymsus-independent primary and secondary reaction. *Immunology* **59**: 261.

Boublik, Y., Di Bonito, P. and Jones, I. (1995). Eukariotic virus display: Engineering the major surface glycoprotein of the *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis

Virus (AcNPV) for the presentation of foreign proteins on the virus surface. *Byo/Technology* **13**: 1079-1084.

Bräutigam, S., Snezhkov, E. and Bishop, D. H. L. (1993). Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3 and VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus polyprotein. *Virology* **192**: 512-524.

Broekhuijsen, M. P., Van Rijn, J. M. M., Blom, A. J. M., Pouwels, P. H., Engel-Valk, B. E., Brown, F. and Francis, M. J. (1987). Fusion proteins with multiples copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both the natural host and laboratory animals. *Journal of General Virology* **69**: 3137-3140.

Brooksby, J.B. (1982) Portraits of viruses: Foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* **18**: 1-23.

Brown, F., Hyslop, N., Crick, J. and Morrow, A. (1963). The use of acetyl-ethylenimine in the production of inactivated foot-and-mouth disease vaccines. *J. Hyg.* **61**: 337.

Burroughs, J., Rowlands, D., Sangar, D., Talbot, P. And Brown, F. (1971). Further evidence for multiple proteins in the foot-and-mouth virus particles. *J. Gen. Virol.* **13**: 73-84.

Burrell, C. J., Mackay, P., Greenaway, P. J., Hofschneider, P. H. And Murray, K. (1979). Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature* **296**: 43-47.

Carrillo, E., Giachetti, C., and Campos, R. (1984). Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth virus replication. *Virology* **135**: 542-545.

Carroll, A. R., Rowlands, D. J. and Clarke, B. E. (1984). The complete nucleotide sequence of the RNA coding for the primary translation product of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res.* **12**: 2461-2472.

Clarke, B. E., Newton, S. E., Carroll, A. R., Francis, M. J., Appleyard, G., Syred, A. D., Highfield, P. E., Rowland, D. J. and Brown, F. (1987). Improved immunogenicity of a peptide epitope after fusion to hepatitis B core protein. *Nature* **330**: 381-386.

Clarke, B. E., Brown, A. L., Grace, K. G., Hastings, G. Z., Brown, F., Rowlands, D. J., and Francis, M.J. (1990). Presentation and immunogenicity of viral epitopes on the surface of hybrid hepatitis B virus core particles produced in bacteria. *J Gen Virol* **71**: 1109-1117.

Cohen, B. J. and Richmond, J. E. (1982). Electron microscopy of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli*. *Nature* **296**: 677-678.

Collen, T., Pullen, L., and Doel, T. R. (1989). T cell dependent induction of antibody against foot-and-mouth disease virus in a mouse model. *J. Gen Virol.* **70**: 395-403.

Collen, T., and Doel, T. R. (1990). Heterotypic recognition of foot-and-mouth disease virus by cattle lymphocytes. *J. Gen Virol.* **71**: 309-315.

Cowan, K., and Graves, J. H. (1966). A third antigenic component associated with foot-and-mouth disease infection. *Virology* **30**: 528-540.

Cowan, K. (1968). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease. Preparation and evaluation of antisera specific for virus, virus protein subunit and the infection associated antigen. *J. Immunol.* **199**: 1183.

Crawford, S. E., Labbe, M., Cohen, J., Borroughs, M. H., Zhou, Y. J. and Estes, M. K. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* **68**: 5945-5952.

Cunha, R. And Eichorn, E. (1954). Influence of cortisone on susceptibility to foot-and-mouth disease virus. *Am. J. Vet. Res.* **15**: 149.

Cwirla, S. E., Peters, E. A., Barrett, R. W. and Dower, W. J. (1990). Peptides on phage: A vast library of peptides for identifying ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6378-6382.

Chambers, M. A., Dougan, G., Newman, J., Brown, F., Crowther, J., Mould, A. P., Humphries, M. J., Francis, M. J., Clarke, B., Brown, A. L., and Rowlands, D. (1996). Chimeric hepatitis B virus core particles as probes for studying peptide-integrin interactions. *J. Virol.* **70**: 4045-4052.

Charlton, C. A., and Volkman, P. A. (1993). Penetration of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus nucleocapsids into IPLB Sf21 cells induces actin cable formation. *Virology* **197**: 245-254.

Chartejee, N. K., Bachrach, H. L. and Polatnik, J. (1976). Foot-and-mouth disease virus RNA, presence of 3' terminal polyriboadenilic acid and absence of amino acid binding ability. *Virology* **30**: 528-540.

Chinsangaram, J., Mason, P. W. and Grubman, M. J. (1988). Protection of swine by live and inactivated prepared from leader proteinase-deficient serotype A12 foot-and mouth disease virus. *Vaccine* **16**: 1516-1522.

Chow, M., Newman, J. F. E., Filman, D., Hogle, J. M., Rowlands, D. and Brown, F. (1987). Myristilation of picornavirus capsid protein VP4 and its structural significance. *Nature* **327**: 482-486.

Delchambre, M., Gheysen, D., Thines, D., Thiriart, C., Jacobs, E., Verdin, E., Horth, M., Burny, A. and Bex, F. (1989). The gag precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J.* **8**: 2653-2660.

DiMarchi, R., Brooke, G., Gale, C., Cracknell, V., Doel, T., and Mowat, N. (1986). Protection of cattle against foot-and-mouth disease by a synthetic peptide. *Science* **232**: 639-641.

Dittmer, U., Brooks, D. M., and Hasenkrug, K. J. (1999). Protection against establishment of retroviral persistence by vaccination with a live attenuated virus. *J Virol.* **73**: 3753-3757.

Domingo, E., Mateu, G., Martínez, M. A., Dopazo, J., Moya, A. And Sobrino, F. (1990). Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. In: Kurstak, R. G., Marusyk, F. A., Murphy and M. H. V. Van Regenmortel (eds). *Applied Virology Research. Vol II*, pp. 233-259. Plenum Publishing Corporation, N. Y.

Edman, J. C., Hallewell, R. A., Valenzuela, P., Goodman, H. M., and Rutter, W. J. (1981). Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*. *Nature* **291**: 503-506.

Elahi, S. M., Shen, S. .H, Talbot, B. G., Massie, B., Harpin, S., and Elazhary, Y. (1999). Induction of humoral and cellular immune responses against the nucleocapsid of bovine viral diarrhea virus by an adenovirus vector with an inducible promoter. *Virology* **15**: 261(1):1-7.

Fernández, F., Borca, M., Sadir, A. M., Fondevila, N., Mayo, J and Schudel, A. (1986). Foot-and-mouth disease virus (FMDV) experimental infection: susceptibility and immune response in adult mice. *Vet. Microbiol.* **12**: 15-24.

Ferstanding Arnold, G., Resnick, D. A., Li, Y., Zhang, A., Smith, A. D., Geisler, S. C., Jacob-Molina, A., Lee, W. M., Webster, R. G. And Arnold, E. (1994). Design and construction of rhinovirus chimeras incorporating immunogens from polio, influenza, and human immunodeficiency virus. *Virology* **198**: 703-708.

Forman, A.J. and Gibbs, E.P.J. (1974). Studies with foot-and-mouth disease virus in british deer (red, fallow and roe). I. Clinical disease. *Journal of Comparative Pathology* **84**: 215-220.

Fox, G., Parry, N., Barnett, P. V., Mc Ginn, B., Rowlands, D. J. and Brown, F. (1989). The cell attachment site in foot-and-mouth disease virus includes the aminoacid sequence RGD (Arginine-Glycine-Aspartic acid) *J. Gen. Virol.* **70**: 625-637.

Fooks, A. R., Stephenson, J. R., Warnes, A., Dowset, A. B., Rima, B. K. and Wilkinson, G. W. G. (1993). Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsids-like structures. *J. Gen Virol.* **74**: 1439-1444.

Forss, S., Strebel, K., Beck, E., Schaller, H. (1984). Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus. *Nucleic Acids Res* **12**: 6587-601.

Fracastorius, H. (1546). *De contagione et contagiosis morbis et curatione*, Bk 1, Chap. 12, Venezia.

Francis, M.J. and Clarke, B.E. (1989). Peptide vaccines based on enhanced immunogenicity of peptide epitopes presented with T-cell determinants or hepatitis B core protein. *Methods in Enzimology* **178**: 659-673.

Francis, M. J., Hastings, G. Z., Brown, A. L., Grace, K. G., Rowlands, D. J., Brown, F., Clarke, B. E. (1990). Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 2545-2549.

French, T. J. and Roy, P. (1990). Synthesis of bluetongue virus (BTV) corelike particles by a recombinant baculovirus expressing the two major structural core proteins of BTV. *J. Virol.* **64**: 1530-1536.

French, T. J., Marshall J. J. A. and Roy, P. (1990). Assembly of double-shelled, virus-like particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J. Virol.* **64**: 5695-5700.

Frenkel, S.H. (1951). Research on foot-and-mouth disease II. The cultivation of the virus on a practical scale in explantations of bovine tongue epithelium. *Am. J. Vet. Res.* **12**: 187-199.

Gheysen, D., Jacobs, E., de Foresta, F., Thiriart, C., Francotte, M., Thines, D. and de Wilde, M. (1989). Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Cell* **59**: 103-112.

Ghiasi, H., Kaiwar, R., Nesburn, A. B. and Wechsler, S.L. (1992). Baculovirus expressed glycoprotein H (gH) of Herpes simplex virus type 1 induces neutralizing antibody and delayed hypersensitivity responses but does not protect immunized mice against lethal HSV-1 challenge. *J. Gen. Virol.* **73**: 719-722.

Ghiasi, H., Kaiwar, R., Nesburn, A. B., Wechsler, S. L. (1992). Baculovirus-expressed glycoprotein G of herpes simplex virus type 1 partially protects vaccinated mice against lethal HSV-1 challenge. *Virology* **190**:233-239

Ghiasi, H., Nesburn, A., and Wechsler, S. (1996). Vaccination with a cocktail of seven recombinantly expressed HSV-1 glycoproteins protects against ocular HSV-1 challenge more efficiently than vaccination with any individual glycoprotein. *Vaccine*, **14**: 107-112.

Giavedoni, L. D., Kaplan, G., Marcovecchio, F., Piccone, M. E. and Palma, E. L. (1991). Protection conferred by TRpE fusion proteins containing portions of the C terminal region of capsid protein VP1 of foot-and-mouth disease virus. *J. Gen. Virol.* **72**: 967-971.

Golini, Nomoto, A., Wimmer, R. (1978). The genome-linked proteins of picornavirus I. Difference in the VPgs of encephallomyocarditis virus and poliovirus as evidence that genome-linked proteins are virus-coded. *Virology* **89**: 112-118.

Goodman-Snitkoff, G., Eisele, L.E., Heimer, E.P., Felix, A.M., Andersen, T.T., Fuerst, T.R., and Mannino, R.L. (1990) Defining minimal requirements for antibody production to peptide antigens. *Vaccine* **8**: 257-262.

Grubman, M. J., Lewis, S. A. and Morgan, D. O. (1993). Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* **11**: 825-829.

Haanes, E. J., Guimond, P., and Wardley, R. (1997). The bovine parainfluenza virus type-3 (BPIV-3) hemagglutinin/neuraminidase glycoprotein expressed in baculovirus protects calves against experimental BPIV-3 challenge. *Vaccine* **15**: 730-738.

Habel, K. (1969). Virus neutralization test. In: *Fundamental techniques in Virology* (Habel, K., and Salzman, N. P. eds.) Academic Press New York. 288-296.

Hagensee, M. E., Yaegashi, N., Galloway, D. A. (1993). Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* **67**: 315-322.

Harford, H., Cabezón, T., Crabeel, M, Rutgers, A. and De Wilde, M. (1982). Expression of hepatitis B surface antigen in yeast; in *Dev. Biol. Standard Second WHO/IABS Symposium on Viral Hepatitis: Standardization in Immunoprophylaxis of Infections by Hepatitis B viruses*. Basel, Karger, vol 54 pp 125-130.

Harris, K. S., Ut, C., and Wimmer, H. (1990). Proteolytic processing in the replication of picornaviruses. *Sem. Virol.* **1**: 325-333.

Hogle, J.M., Chow, M., and Fildman, D.J. (1985). Three dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**: 1358-1365.

Honda, M., Matsuo, K., Nakasone, T., Okamoto, Y., Yoshizaki, H., Kitamura, K., Sugiura, W., Watanabe, K., Fukushima, Y., Haga, S., et al. (1995). Protective immune responses induced by secretion of a chimeric soluble protein from a recombinant *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vector candidate vaccine for human immunodeficiency virus type 1 in small animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92(23)**:10693-10697.

House, C., and House, J.A. (1989). Evaluation of techniques to demonstrate foot-and-mouth disease virus in bovine tongue epithelium: comparison of the sensitivity of cattle, mice, primary cell cultures, cryopreserved cell cultures and established cell lines. *Vet Microbiol* **2**: 99-109.

Jacobs, E., Rutgers, T., Voet, O. P., Dewerchin, M., Cabezón, T. and De Wilde, M. (1989). Simultaneous synthesis and assembly of various hepatitis B surface proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **80**: 279-291.

Jagadish, M. N., Ward, C. W., Gough, K. H., Tulloch, P. A., Whittaker, L. A. and Shukla, D. D. (1991). Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J. Gen Virol.* **72**: 1543-1550.

Jarvis, D.L., and García, A. Jr. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology* **205**: 300-313.

Kajigaya, S, Fujii, H., Field, A., Anderson, S., Rosenfeld, S., Anderson, L. J., Shimada, T. and Young, N. S. (1991). Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 4646-4650.

Kirnbauer, R, Booy, F, Cheng, N., Lowry, D. R. and Schiller, J. T. (1992). Papillomavirus L1 major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 12180-12184.

Kit, S., Kit, M., Di Marchi, R., Little, S. P. and Gale, C. (1991). Modified-live infectious bovine rhinotracheitis virus vaccine expressing monomer and dimer forms of foot-and-mouth disease capsid protein epitopes on surface of hybrid virus particles. *Arch Virol* **120**: 1-17.

Kitson, J. D. A., Mc Cahon, D and Belsham, G. J. (1990). Sequence analysis of monoclonal antibody resistant mutants of type O foot-and-mouth disease virus: Evidence for the involvement of the three surface exposed capsid proteins in four antigenic sites. *Virology* **179**: 26-34.

Kleid, D. G., Yansura, D., Small, B., Dowbenko, D., Moore, D.M., Grubman, M. J., McKercher, P. D., Morgan, D. O., Robertson, B. H. and Bachrach, H. L. (1981). Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science* **214**: 1125-1129.

Kuhn, R., Luz, N., and Beck, E. (1990). Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **64**: 4625-4631.

Küpper, H., Keller, W., Kurz, C., Fross, S., Schaller, H., Franze, R., Strohmaier, K., Marquardt, O., Zaslavsky, V. G., and Hofschneider, P. H. (1981). Cloning of cDNA of major antigen of foot-and-mouth disease virus.. *J. Virol.* **64**: 4625-4631.

Laporte, J., Groschande, J., Wantyghem, J., Bernard, S. and Rouze, P. (1973). Neutralisation en culture cellulaire du pouvoir infectieux du virus de la fièvre aphteuse par des sérums provenant de porcs immunisés a l'aide d'une protéine virale purifié. *C. R. Hebd. Séam. Acad. Sci. Paris* **276**: 3390-3401.

Lea, S., Hernández, J., Blakemore, W., Brochi, E, Curry, S., Domingo, E. , Fry, E, Abu-Ghazaleh, R., King, A., Newman, J., Stuart, D, and Mateu, M. G. (1994). The

structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**: 123-139.

Lee, F. Y., Nomoto, A., Detjen, B. M., Wimmer, R. (1977). A protein covalently linked to poliovirus genome RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**: 59-63.

Lewis, S. A., Morgan, D. O. and Grubman, M. J. (1991). Expression, processing and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: Induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *Journal of Virology* **65**: 6572-6580.

López, O., Sadir, A. M., Borca, M., Fernández, F., Braun, M. and Schudel, A (1990). Immune response to foot-and-mouth disease virus in an experimental murine model II: Basis of persistent antibody reaction. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **24**: 313.

Loudon, T., and Roy, P. (1991). Assembly of five bluetongue virus proteins expressed by recombinant baculoviruses: Inclusion of the largest protein VP1 in the core and virus-like particles. *Virology* **180**: 798-802.

Lucas-Lenard, J. M. (1979). "The molecular biology of picornaviruses". P. 73. Pérez-Bercoff, Cambridge University Press, New York.

Luo, L. Li, Y. and Kang, C. Y. (1990). Expression of gag precursor protein and secretion of virus-like gag particles of HIV-2 from recombinant baculovirus-infected insect cells. *Virology* **179**: 874-880.

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

Mason, P. W., Rieder, E. and Baxt, B. (1994). RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 1932-1936

Mason, P. W., Piccone, M. E., Mc Kenna, T.S.C., Chinsangaram, J. and Grubman, M. J. (1997). Evaluation of a live-attenuated foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **227**: 96-102.

Mastico, R. A., Talbot, S. J. and Stockley, P. G. (1993). Multiple presentation of foreign peptides on the surface of an RNA-free spherical bacteriophage capsid. *J. Gen Virol.* **74**: 541-548.

Mateu, M. G., Rocha, E., Vicente, O. Vayreda, F., Navalporto, C., Andreu, D. Pedroso, E., Giralt, E., Enjuantes, L., and Domingo, E. (1987). Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* **8**: 261-274.

Mateu, M. G., Martínez, M. A., Capucci, L., Andreu, D., Giralt, E., Sobrino, F., Brocchi, E. and Domingo, E. (1990). A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J. Gen. Virol.* **71**: 629-637.

McCafferty, J., Griffiths, A., Winter, G. and Chiswell, D.J. (1990). Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**: 552-554.

McCullough, K. C., Crowter, J. R., Butcher, R. N., Carpenter, W. C., Brocchi, E., Capucci, L. and De Simone, F (1986) Immune protection against foot-and-mouth disease virus studied using virus neutralizing and non-neutralizing concentrations of monoclonal antibodies. *Immunology* **58**: 421-428.

Mc Kenna, T. S. C., Lubroth, J., Rieder, E., Baxt, B. and Mason, P. (1995). Receptor binding site-deleted foot-and-mouth disease (FMD) virus protects cattle from FMD. *Journal of Virology* **69**: 5787-5790.

Meloan, R. H. and Barteling, S. J. (1986). An epitope located at the C-terminus of isolated VP1 of foot-and-mouth disease virus O induces neutralizing activity but poor protection. *J. Gen. Virol.* **67**: 289-294.

Michel, M. L., Mancini, M., Riviere, Y., Dormont, D., Tiollais, P. (1990). T and B lymphocyte responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1 in macaques immunized with hybrid HIV/hepatitis B surface antigen particles. *J Virol* **64**: 2452-2455.

Milich, D. R., and McLachlan, A. (1986). The nucleocapsid of hepatitis B virus is both T-cell-independent and T-cell-dependent antigen. *Science* **234**: 1398-1401.

Milich, D. R., McLachlan, A., Stahl, S., Wingfield, P., Thornton, G. B., Hughes, J. L. and Jones, J. E. (1988). Comparative immunogenicity of hepatitis B core and e antigens. *J. Immunol.* **141**: 3617-3624.

Morgan, D.O., Moore, D. and McKercher, P. (1980). Vaccination against foot-and-mouth disease. In: *New developments with Human and Veterinary Vaccines*. Alan A. Liss, Inc., N. Y.

Morgan, D. O and Moore, D.M. (1990). Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *American Journal of Veterinary Research* **51**: 40-45.

Moscufo, N., Simons, J., and Chow, M. (1991). Myristoylation is important at multiple stages in poliovirus assembly. *J Virol* **65**: 2372-2380.

Mowat, G.H. (1961). Multiplication "in vivo" of modified foot-and-mouth disease virus. *Res. Vet. Sci.* **2**:153

Mowat, G.H. and Chapman, W.G. (1962). Growth of foot-and-mouth disease virus in fibroblastic cell line derived from hamster kidneys. *Nature* **194**: 253-257.

Mowat, G.H. (1964). Selection of attenuated strains of foot-and-mouth disease virus by cloning in tissue culture. *Bull. Off.Int. Epiz.* **61**:639

Murray, K., Bruce, S. A. Hinnen, A., Wingfield, P., van Eerd, P., de Reus, A. and Schellekens, A. (1984). Hepatitis B virus antigens made in microbial cells immunise against viral infection. *EMBO J.* **3**: 645-650.

Newman, J. F., Piatti, P. G., Gorman, B. M., Burrage, T. G., Ryan, M. D., Flint, M., and Brown, F. (1994). Foot-and-mouth disease virus particles contain replicase protein 3D. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 733-737.

O'Reilly, D., Miller, L. K., and Luckow, V. A. (1992). "Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual". W. H. Freeman and Company, New York, N. Y.

Parmley, S. F. and Smith, G. P. (1988). Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: Affinity purification of target genes. *Gene* **73**: 305-318.

Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., Mackay, P., Leadbetter, G and Murray, K. (1979). Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature* **282**: 575-579.

Pereyra, H.G. (1981). Foot-and-mouth disease In Gibbs, E.P.J. (ed). *Virus disease of food animals*, vol 2, pp. 333-363. Academic Press Inc., London.

Pfaff, E., Thiel, H. J., Beck, E., Strohmaier, K. And Schaller, H. (1988). Analysis of neutralizing epitopes on foot-and-mouth disease virus. *J. Virol.* **62**: 2033-2040.

Piatti, P., Berinstein, A., López, O., Borca, M., Fernández, Schudel A. and Sadir, A. M. (1991). Comparison of the immune response elicited by infectious and inactivated foot-and-mouth disease virus in mice. *J. Gen. Virol.* **72**: 1691.

Pinto, A. and Garland, A. J. M. (1979). Immune response to virus infection-associated (VIA) antigen in cattle repeatedly vaccinated with foot-and-mouth inactivated by formalin or acetyleneimine. *Journal of Hyg.* **82**: 41-50.

Piccone, M. E., Rieder, E., Mason, P. W., and Grubman, M. J. (1995). The foot-and-mouth disease virus leader proteinase gene is not required for viral replication. *Journal of Virology* **70**: 5638-5641.

Porta, C., Spall, V. E., Loveland, J., Johnson, J. E., Barker, P. J., and Lomonosoff, G. P. (1994). Development of cowpea mosaic virus as a high-yielding system for the presentation of foreign peptides. *Virology* **202**: 949-955.

Porter, A.G., Fellner, P., Black, D., Rowlands, D., Harris T. J. and Brown, F. (1978). 3' Terminal nucleotide sequences in the genome RNA of picornaviruses. *Nature* **276**: 298-301.

Porter, A.G. (1993). Picornavirus nonstructural proteins: emerging roles in virus replication and inhibition of host cell functions. *J. Virol.* **67**: 6917-6921.

Radlet, P.J., Pay, T.W.F. and Garland, A.J.M. (1985). The use of BHK suspension cells for the commercial production of foot-and-mouth disease vaccines over a twenty year period. *Dev. Biol. Stand.* **60**: 163-170.

Rasmussen, L., Battles, J. K., Ennis, W. H., Nagashima, K. and Gonda, M. A.(1990). Characterization of virus-like particles produced by a recombinant baculovirus containing the gag gene of the bovine immunodeficiency-like virus. *Virology* **178**: 435-451.

Redmond, M. J., Ijaz, M. K., Parker, M. D., Sabara, M. I., Dent, D., Gibbons, E. and Babiuk, L. A. (1993). Assembly of recombinant rotavirus proteins into virus-like particles and assessment of vaccine potential. *Vaccine* **11**: 273-281.

Rieder, E., Bunch, T., Brown, F. and Mason, P. W. (1993). Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly (C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *Journal of Virology* **67**, 5139-5145.

Rivenson, S., Sadir, A.M., Gaggino, O.P., Marcovecchio, F.E., Zabal, O. and Laporte, O. (1982). Estudio comparativo en bovinos de dos vacunas antiaftosa: oleosa e hidroxisaponinada. *Rev. Med. (Buenos Aires)* **63**: 364-370.

Roberts, S.R. and Manning, J.S. (1993) The major envelope glycoprotein of the extracellular virion of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus posses at least three distinct neutralising epitopes. *Virus Res.* **28**: 285-297.

Roosien, J., Belsham, G. J., Ryan, M. D., King, M. Q. and Vlak, J. M. (1990). Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression system. *Journal of General Virology* **71**: 1703-1711.

Rose, R. C., Bonnez, W., Da-Rin, C., McCance, D. J. and Reichman, R. C. (1994). Serological differentiation of human papillomavirus types 11, 16 and 18 using recombinant virus-like particles. *J. Gen.Virol.* **75**: 2445-2449.

Rosen, E., Stapleton, J. E. and McLinden, J. (1993). Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* **11**: 706-712.

Rowlands, D. J., Sangar, D. V. and Brown, F. (1975). A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Journal of Virology* **64**: 4099-4107.

Rueckert, R. (1985). Picornaviruses and their replication. In: *Virology*. Ed. B. Fields pp 705. Raven Press, N. Y.

Ruffing, M., Zentgraf, H. and Kleinschmidt, J. A.(1992). Assembly of virus-like particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J. Virol.* **66**: 6922-6930.

Rweyemamu, M.M., Terry, G. and Pay, T.W.F. (1979). Stability and immunogenicity of empty particles of foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* **59**: 69-79.

Saiz, J. C., González, M. J, Morgan, D. O., Card, J. L., Sobrino, F. And Moore, D. M. (1989). Antigenic comparison of different foot-and-mouth disease virus types using monoclonal antibodies defining multiple neutralizing epitopes on FMDV A5 subtypes. *Virus Res.* **13**: 45-60.

Saiz, J. C., González, M. J., Borca, M. V., Sobrino, F. And Moore, D. M. (1991). Identification of neutralizing antigenic sites on VP1 and VP2 of type A5 foot-and-mouth disease virus defined by neutralizing resistant variants. *J. Virol.* **65**: 2518-2524.

Saiz, J.C., Cairó, J., Medina, M., Zuidema, D., Abrams, C., Belsham, G., Domingo, E. and Vlak, J. (1994). Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. *J. Virol.* **68**: 4557-4564.

Salimans, M. M. M., van Bussel, M. J. A. W. M., Brown, C. S. and Spaan, W. J. M. (1992). *J. Virol. Methods* **39**: 247-258.

Sangar, D. V. (1979). The replication of Picornaviruses. *J. Gen Virol.* **45**:1-13

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 6286-6290.

Sanz-Parra, A., Blasco, R., Sobrino, F. and Ley, V. (1998). Analysis of the B and T cell response in guinea pigs induced with a recombinant vaccinia expressing foot-and-mouth disease virus structural proteins. *Arch. Virol.* **143**: 389-398.

Schödel, F., Neckermann, G., Peterson, D., Fuchs, K, Fuller, S., Will, H. and Roggendorf, M. (1993). Immunization with recombinant woodchuck hepatitis virus nucleocapsid antigen or hepatitis B virus nucleocapsid antigen protects woodchucks from woodchuck hepatitis virus infection. *Vaccine* **11**: 624-628.

Scott, J. K. and Smith, G. P. (1990). Searching for peptide ligands with an epitope library. *Science* **249**: 386-390.

Shahan, M. (1962) The virus of foot-and-mouth disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **101**: 444.

Silberstein, E., Kaplan, G., Taboga, O., Duffy, S., Palma, E. (1997). Foot-and-mouth disease virus-infected but not vaccinated cattle develop antibodies against recombinant 3AB1 nonstructural protein. *Arch Virol*; **142**:795-805.

Spearman, P., Wang, J. J., Vander Heyden, N., Ratner, L. (1994). Identification of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein domains essential to membrane binding and particle assembly. *J Virol* **68**: 3232-3242.

Stahl, S. J., Murray, K.. (1989). Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis B virus core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **16**: 6283-7.

Stave, J. W., Card, J. L. And Morgan, D. O. (1986). Analysis of foot-and-mouth disease virus type O Brugge neutralization epitopes using monoclonal antibodies. *J. Gen. Virol.* **67**: 2083-2092.

Strohmaier, L. (1967) Virus concentration by ultracentrifugation. *Meth. Virol.* **3**: 45-49.

Strohmaier, K., Franze, R., and Adam, K. H. (1982). Location and characterization of the antigenic portion of the FMDV immunizing protein. *J Gen Virol* **59**: 295-306.

Subak-Sharpe, H. (1961). The effect of passage, history, route of inoculation, virus strain and host strain on susceptibility of adult mice to the virus of foot-and-mouth disease. *Arch. Ges. Virusforsch.* **3**: 337.

Subak-Sharpe, H., Pringle, C. And Hollom, S. (1962) Factors influencing the dynamics of multiplication of foot-and-mouth disease virus in adult mice. *Arch. Ges. Virusforsch.* **5**: 600.

Summers, M. D. and Smith, G. E. (1987). A manual of methods for bavulovirus vectors and insect cell culture procedures. Texas Agricultural Experimental Station Bulletin 1555. Texas A&M University, College Station, Tex.

Taboga, O., Tami, C., Carrillo, E., Nunez, J. I., Rodriguez, A., Saiz, J. C., Blanco, E., Valero, M. L., Roig, X., Camarero, J. A., Andreu, D, Mateu, M. G., Giralt, E., Domingo, E., Sobrino, F., and Palma, E. L. (1997). A large-scale evaluation of peptide vaccines against foot-and-mouth disease: lack of solid protection in cattle and isolation of escape mutants. *J Virol* **71**: 2606-2614.

Takehara, K., Ireland, D., and Bishop, D. H. (1988). Co-expression of the hepatitis B surface and core antigens using baculovirus multiple expression vectors. *J Gen Virol* **69**: 2763-2777.

Talbot, P. and Brown, F. (1972). A model for foot-and-mouth disease. *J. Gen. Virol.* **15**, 163.

Talbot, P., Rowlands, D. J., Burroughs, J., Sangar, D. and Brown, F. (1973) Evidence for a group protein in foot-and-mouth disease particles. *J. Gen. Virol.* **19**: 369-380.

Thomsen, D. R., Meyer, A. L. and Post, L. E. (1992). Expression of feline leukaemia virus gp85 and gag proteins and assembly into virus-like particles using the baculovirus expression vector system. *J. Gen. Virol.* **73**: 1819-1824.

Thomson, G. R. (1996). La función de los animales portadores en la transmisión de la fiebre aftosa en 64ª Sesión General de la Organización Mundial de la Sanidad Animal.

Tymoney, J. F., Gillespie, J. H., Fredric, W. S., and Barlough, J. E. (1988) Section II: RNA virus families. Ch. 47: The Picornaviridae. P. 167. In: "The Hagan and Burner's microbiology and infectious diseases of domestic animals". 8ª Es. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca.

Usha, R., Rohll, J. B., Spall, V. E., Shanks, M., Maule, A. J., Johnson, J. E. and Lomonosoff, G. P. (1993). Expression of an animal virus antigenic site on the surface of a plant virus particle. *Virology* **197**: 366-374.

Valenzuela, P., Medina, A., Rutter, W. J., Ammerer, G. and Hall, B. D. (1982). Synthesis and assembly of hepatitis B surface antigen particles in yeast. *Nature* **298**: 347-350.

Van Bekkum, J. G. (1959). Correlation between serum antibody level and protection against challenge with FMD. Session of Research Group of the standing Technical Committee of the European Commission for the Control of Foot-and-Mouth Disease, Brescia, Italy, FAO.

Vasquez, C., Palma, E. L., and Barrantes, J. (1972). Foot-and-mouth disease virus. Capsid fine structure. *J. Microsc.* **14**: 147-154.

Vasquez, C., Denoya, C. D., La Torre, J. L., and Palma, E. L. (1979). Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology* **97**: 195-200.

Volkman, L.E. and Goldsmith, P.A. (1984). Budded *Autographa californica* NPV 64K protein: further biochemical analysis and effects of immunoprecipitation sample preparation conditions. *Virology* **139**: 295-302.

Volkman, L.E. and Goldsmith, P.A. (1985). Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology* **143**: 185-195.

Volpers, C., Schirmacher, P., Streeck, R. E. and Sapp, M. (1994). *Virology* **200**: 504-512.

Wagner, G.G., Card, J.I. and Coean, K.M. (1970). Immunochemical studies of foot-and-mouth disease virus. VII. Characterization of foot-and-mouth disease virus concentrated by poliethylenglycol precipitation. *Arch. Ges. Virusforsch* **30**: 343-350.

Wardley, R., Berlinski, P., Thomsen, D., Meyer, A., and Post, L. (1992). The use of feline herpesvirus and baculovirus as vaccine vectors for the *gag* and *env* genes of feline leukaemia virus. *J. Gen. Virol.* **73**: 1811-1818.

Wang, L., Huang, J. A., Nagesha, H. S., Smith, S. C., Phelps, A., Holmes, I., Martyn, J. C., Coloe, P. J., and Reeves, P. R. (1999). Bacterial expression of the major antigenic regions of porcine rotavirus VP7 induces a neutralizing immune response in mice *Vaccine* **17**: 2636-2645.

Whitford, M., Stewart, S., Kuzio, J., and Faulkner, P. (1989). Identification and sequence analysis of a gene encoding gp67 an abundant envelope glycoprotein of the baculovirus, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *J. Virol.* **63**: 1393-1399.

Willemse, M. J., van Schooneveld, S. H., Chalmers, W. S., and Sondermeijer, P. J. (1996). Vaccination against feline leukaemia using a new feline herpesvirus type 1 vector. *Vaccine* **14(16)**:1511-1516.

Zeng, C. Q., Labbe, M., Cohen, J., Prasad, B. V., Chen, D., Ramig, R. F., Estes, M. K. (1994). Characterization of rotavirus VP2 particles. *Virology* **201**: 55-65.

Zibert, A., Maass, G., Strebel, K., Falk, M. M. and Beck, E. (1990). Infectious foot-and-mouth disease virus derived from cloned full-length cDNA. *Journal of Virology* **64**: 2467-2473.