



### CARACTERIZACIÓN DE CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDO ROTAVIRALES DE DOBLE Y TRIPLE CAPA EN EL SISTEMA DE CÉLULAS DE INSECTO BACULOVIRUS

Ricardo Castro-Acosta, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001 Col. Chamilpa Cuernavaca Morelos C.P. 62210, Fax: (777)-3138811, [rcastro@ibt.unam.mx](mailto:rcastro@ibt.unam.mx), [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx)

*Palabras clave: Partículas pseudo rotavirales (PPR), sistema de células de insecto baculovirus (SCI-BV), electroforesis capilar zonal (ECZ).*

**Introducción.** Los rotavirus son la principal causa de muertes por diarrea en niños menores de 5 años (~600,000 muertes al año). Las partículas pseudo virales (PPV) son proteínas virales recombinantes que se ensamblan en una estructura idéntica a la cápside viral. Al no contener el material genético y poseer características inmunogénicas similares a los virus nativos, se han utilizado como vacunas. Las PPV de rotavirus (PPR) tienen 3 capas de proteína y su producción requiere la expresión simultánea de varias proteínas estructurales del virus. Al producir las en el sistema de células de insecto baculovirus (SCI-BV) se obtienen PPR de una capa (sl) (VP6), doble capa (dl) (VP2 y VP6) y triple capa (tl) (VP2, VP6 y VP7). Una vacuna basada en PPR requiere obtener mayoritariamente tIPPR. Por lo tanto, es necesario un sistema adecuado de cuantificación y diferenciación de las diversas estructuras. En este trabajo se desarrolló un método para diferenciar entre las diversas PPR y cuantificarlas, el cual se utilizó para seguir las cinéticas de producción de estas partículas.

**Metodología.** La producción de PPR se realizó coinfectando células de insecto High Five® con 2 (producción de dIPPR) o 3 baculovirus (producción de tIPPR) que codifican para las proteínas EGFPVP2 (proteína de fusión EGFP-VP2), VP6 y VP7. La coinfección se llevó a cabo en matraces de 250 mL (volumen de operación de 60 mL) a una concentración celular de  $0.5 \times 10^6$  cel/mL y una multiplicidad de infección de 1 ufp/cel para cada baculovirus. La cuantificación de dIPPR y tIPPR se realizó en HPLC utilizando dos columnas de exclusión molecular (Ultrahydrogel 2000 y 500) instaladas en serie, las que permiten separar las cápsides virales de proteínas no ensambladas (Mena et al., 2005). Además, se utilizó la electroforesis capilar zonal (ECZ), para separar partículas con base en sus diferencias en la relación carga/masa.

**Resultados y discusión.** Por HPLC se determinó la concentración de PPR en los cultivos y se evaluaron cinéticas de producción de dIPPR y tIPPR. Se determinó la eficiencia de ensamblaje de EGFPVP2 en la producción de dIPPR y tIPPR, la que fue de 9.2 y 25%,

respectivamente. La baja eficiencia de ensamblaje de EGFPVP2 estuvo acompañada por una alta degradación de la proteína de fusión, la que fue 23 veces mayor durante la producción de dIPPR. La velocidad específica de producción de PPR ( $8 \text{ fmol}/10^6 \text{ cel h}$ ), fue 2 veces mayor durante la producción de dIPPR que en la de tIPPR. La tIPPR se encontró principalmente en el sobrenadante del cultivo (53%), mientras que las dIPPR en el pellet celular (80%), lo que es importante para el desarrollo de procesos de purificación de PPR.

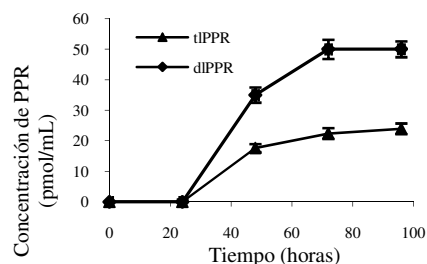


Fig.2. Cinética de producción de dIPPR y tIPPR.

Utilizando la ECZ fue posible diferenciar y cuantificar dIPPR y tIPPR en muestras purificadas, aunque fue imposible en muestras de cultivo. En muestras purificadas de tIPPR se determinó que la relación dIPPR/tIPPR en la muestra fue de 32% y 68%, respectivamente. Se validó la metodología, demostrándose que fue reproducible, exacta y precisa para muestras de dIPPR y tIPPR.

**Conclusiones.** Esta es la primera vez que se evalúa la producción de tIPPR en cultivo, por lo que es un paso importante para el desarrollo de estrategias de producción más eficientes. Además, la metodología implementada por ECZ permitirá realizar análisis más eficientes de las PPR para sus posteriores aplicaciones.

**Financiamiento.** CONACYT-SAGARPA 2004-C01-103, PAPIIT-UNAM 223805 y 206407.

#### Bibliografía.

1. Mena J.A., et al. (2005). Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B*. 824(1-2): 267-276