Vectores baculovirales de nueva generación, liberadores de episomas replicativos en mamíferos

Simonin, JA(1); Bauzá, MDR(2); Ledesma, FT(1); Scharn, A(2); Cuccovia Warlet, FU(1); Olea, DF(2); Cerrudo, C(1); Belaich, MN(1).

(1) Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos, Universidad Nacional de Quilmes; (2) Instituto de Medicina Traslacional, Trasplante y Bioingeniería-IMETTYB, Universidad Favaloro, CONICET.

Contacto: alejandro.simonin@gmail.com

Los baculovirus se caracterizan por poseer genomas grandes de ADN circular doble cadena y por infectar lepidópteros, himenópteros y dípteros. Sin embargo, también, son capaces de transducir de manera eficiente células de mamíferos, manteniéndose como episomas no replicativos dentro del núcleo celular, lo que ha dado lugar a las tecnologías BacMam (baculovirus empleados en mamíferos). En ese sentido, los baculovirus son actualmente evaluados como vectores virales terapéuticos, permitiendo así el desarrollo de terapias génicas y vacunas. Su incapacidad de infectar células humanas, pero sí de transducirlas, contribuyen en parámetros de bioseguridad e inmunogenicidad con respecto a otros sistemas virales, como los adenovirus. Sin embargo, como ocurre con todos los vectores virales, es necesario mejorar y ampliar sus prestaciones para obtener nuevas generaciones tecnológicas que brinden mejores resultados. Por ejemplo, la temporalidad de la expresión génica es uno de los factores que puede ser optimizado, dado que es un virus no replicativo ni integrativo. En este contexto, nos propusimos desarrollar baculovirus AcMNPV recombinantes y evaluarlos tanto en células cultivadas *in vitro* como *in vivo* en un modelo de ratas. Así, generamos virus con la capacidad de producir mini-círculos (ADN circular pequeño) y mini-strings (ADN lineal pequeño), que expresan constitutivamente GFP bajo el promotor CMV. Para esto, utilizamos la tecnología Cre/loxP y Protelomerasa/TelRL más el origen de replicación del virus Epstein-Barr, en un sistema binario de dos viriones, uno llevando el gen de interés flanqueado por loxP y TelRL (BacGOI) y, el otro (BacHelp), para expresar los factores colaboradores (Cre y Protelomerasa). La optimización del uso de dos viriones diferentes en células de mamífero se realizó con dos baculovirus recombinantes que expresan GFP o mCherry empleando distintas multiplicidades de infección sobre células HEK 293T. Con estos resultados, se realizaron ensayos con BacGOI y BacHelp, tanto *in vitro* en células HEK 293T, como *in vivo* en un modelo de ratas. En los mismos, se monitoreó la expresión de GFP por microscopía de fluorescencia, y la presencia del mini-círculo/mini-string liberado y del resto del esqueleto viral mediante qPCR en función de los días post-transducción. En síntesis, las evaluaciones realizadas *in vitro* e *in vivo* empleando los baculovirus recombinantes generados mostraron resultados satisfactorios a la hora de prolongar la temporalidad de expresión génica producida por un vector baculoviral, mejorando de esta manera las perspectivas

en el uso de estos viriones como vectores terapéuticos en mamíferos.