



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y  
DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.**

---

**ENSAMBLAJE *IN VITRO* DE PARTÍCULAS PSEUDOVÍRICAS  
QUIMÉRICAS Y ANTÍGENOS COMPLETOS MEDIANTE LA  
INCORPORACIÓN DE DOMINIOS DE ALFA HÉLICE  
SUPERENROLLADA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS EN INNOVACIÓN  
BIOTECNOLÓGICA**

**OPCIÓN TERMINAL  
BIOTECNOLOGÍA MÉDICA Y FARMACÉUTICA**

**P R E S E N T A**

**I.B. LORENA ZAPATA CUELLAR**

**DIRECTOR: DR. ABEL GUTIÉRREZ ORTEGA  
CO-DIRECTORA: DRA. TANYA A. CAMACHO VILLEGAS  
CO-DIRECTOR: DR. JORGE GAONA BERNAL  
ASESORA: DRA. ERIKA NAHOMY MARINO MARMOLEJO**

**GUADALAJARA, JAL. AGOSTO 2017**



Guadalajara, Jalisco a 18 de Agosto de 2017

CONSEJO INSTITUCIONAL DE POSGRADO  
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO  
DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
PRESENTE

Los abajo firmantes miembros del Jurado del Exámen de Grado de la estudiante **Lorena Zapata Cuellar**, una vez leída y revisada la Tesis titulada “ENSAMBLAJE *IN VITRO* DE PARTÍCULAS PSEUDOVÍRICAS QUIMÉRICAS Y ANTÍGENOS COMPLETOS MEDIANTE LA INCORPORACIÓN DE DOMINIOS DE ALFA HÉLICE SUPERENROLLADA” aceptamos que la referida tesis revisada y corregida sea presentada por la estudiante para aspirar al grado de Maestra en Ciencias en Innovación Biotecnológica con opción terminal en Biotecnología Médica Farmacéutica durante el examen correspondiente.

Y para que así conste firmamos la presente al día 18 del mes de Agosto del año dos mil diecisiete.

Dr. Darwin Eduardo Elizondo Quiróga

*Presidente*

Dr. Moisés Martínez Velázquez

*Secretario*

Dr. Abel Gutiérrez Ortega

*Vocal*

## DEDICATORIA

*A mis padres, por enseñarme a siempre tener objetivos que me permitan crecer y tener el coraje para alcanzarlos. Una vida no es suficiente para agradecerles.*

## *Con un profundo agradecimiento*

Al Dr. Abel Gutiérrez Ortega, por aceptarme en su grupo de trabajo y darme la oportunidad de crecer académicamente con uno de sus proyectos. Gracias por ser siempre amable y confiar en mis capacidades.

Al grupo de trabajo: con gran aprecio, a Carlos Manuel por su paciencia, confianza y los conocimientos que me compartió. A Jesús, Brenda, Ana Lilia e Israel por su apoyo en el laboratorio y los gratos momentos compartidos.

Al Dr. Jorge Gaona, infinitamente gracias por la confianza, consejos y apoyo académico.

A la Dra. Tanya Amanda Camacho Villegas, por sus atenciones como co-directora y especialmente por incluirme y apoyarme como parte de su grupo de trabajo.

A mis hermanos por apoyarme y cuidarme siempre.

A mis viejos amigos: Zaira, Juanita, Osvaldo, Alan, Marlene, Rubén, Jesús y Manuel. Por recordarme con sus muestras de cariño y ánimos que la vida te bendice con personas especiales que llegan para quedarse a pesar de la distancia.

A mis nuevos amigos: Mirna, Eli, Dani, Azu, Edwin, Elia, Jorge, Deogsang, Mónica y Mahe. Por su compañía en momentos tristes y alegres, por su compañerismo en momentos de estudio y distracción, pero sobre todo por ser las valiosas personas con quienes he compartido estos dos años.

Al CONACYT, por la beca otorgada para la realización de mis estudios de posgrado.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	vii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS .....	viii
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
3. ANTECEDENTES .....	5
3.1 VLPs .....	5
3.2 Propiedades inmunogénicas de las VLPs.....	7
3.3 VLPs como vacunas .....	10
3.4 VLPs quiméricas.....	11
3.5 Métodos de obtención de VLPs quiméricas.....	12
3.6 VLPs del Virus del grabado del tabaco.....	14
3.7 El dominio $\alpha$ -hélice como motivo de oligomerización en proteínas.....	15
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	19
5. JUSTIFICACIÓN.....	20
6. HIPÓTESIS.....	21
7. OBJETIVOS .....	22
7.1 Objetivo general .....	22
7.2 Objetivos específicos/particulares.....	22
8. METODOLOGÍA.....	23
8.1 Materiales.....	23
8.2 Métodos del estudio.....	24
8.2.1 Análisis <i>in silico</i> de las construcciones.....	24
8.2.2 Análisis <i>in silico</i> y predicción de la estructura terciaria de las proteínas quiméricas .....	25
8.2.3 Construcción de plásmidos recombinantes y transformación celular .....	26
8.2.4 Expresión y purificación de las proteínas TEVK y CP TEV .....	27
8.2.5 Expresión y purificación de las proteínas GFPEN y GFPEC .....	29

8.2.6	Determinación de la formación de VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión .....	30
8.2.7	Análisis comparativo <i>in vitro</i> de la fagocitosis de los bioconjugados o de antígenos solubles por macrófagos.....	30
9.	RESULTADOS.....	32
9.1	Secuencias y configuraciones de las proteínas quiméricas.....	32
9.2	Estructura terciaria de las proteínas quiméricas y propiedades fisicoquímicas teóricas .....	35
9.3	Integración de fragmentos en los plásmidos recombinantes.....	38
9.4	Análisis de expresión de las proteínas quiméricas en <i>E. coli</i> .....	39
9.4.1	Expresión de las proteínas TEVK y CP TEV.....	40
9.4.2	Expresión de las proteínas GFPEN y GFPEC .....	43
9.6	Determinación VLPs quiméricas en presencia de antígenos completos con dominio de hélice alfa superenrollada complementario .....	47
9.7	Actividad fagocítica de macrófagos en presencia de bioconjugados y antígenos solubles .....	49
10.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	51
11.	CONCLUSIONES .....	55
12.	PERSPECTIVAS .....	56
13.	REFERENCIAS.....	57
14.	ANEXOS .....	61
	Anexo 1. Asistencia a congresos .....	61
	Anexo 2. Solicitud de patente .....	62
	Anexo 3. Memoria Técnica para solicitud de patente .....	64
	Anexo 4. Dibujos para solicitud de patente.....	93
	Anexo 5. Listado de secuencias para solicitud de patente .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Pasos clave durante la generación de respuestas inmunes protectoras.....	9
<b>Figura 2.</b> Representación esquemática de la interacción entre dominios $\alpha$ -hélice superenrollada en la encapsulación de GFP.....	15
<b>Figura 3.</b> Representación transversal de $\alpha$ -hélices superenrolladas en disposición paralela y antiparalela unidas por puentes disulfuro.....	17
<b>Figura 4.</b> Representación transversal de un heterodímero E4/K4.....	18
<b>Figura 5.</b> Configuración gráfica de las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas.....	25
<b>Figura 6.</b> Alineamiento de secuencias TEVK vs CP TEV.....	33
<b>Figura 7.</b> Alineamiento de secuencias GFPEN vs GFP.....	34
<b>Figura 8.</b> Alineamiento de secuencias GFPEC vs GFP.....	35
<b>Figura 9.</b> Estructura teórica de las proteínas quiméricas.....	36
<b>Figura 10.</b> Confirmación de la transformación celular y construcciones con el vector de expresión.....	39
<b>Figura 11.</b> Análisis de expresión de las proteínas quiméricas.....	40
<b>Figura 12.</b> Expresión de la proteína TEVK en <i>E. coli</i> .....	41
<b>Figura 13.</b> Inmunodetección y comparación de la distribución de las proteínas TEVK y CP TEV en fracción insoluble y soluble.....	42
<b>Figura 14.</b> Expresión y direccionamiento de GFPEN y GFPEC.....	44
<b>Figura 15.</b> Identificación de TEVK y CP TEV en el proceso de purificación por IMAC.....	45
<b>Figura 16.</b> Análisis de la purificación de TEVK y CP TEV.....	45
<b>Figura 17.</b> Análisis de la purificación de GFPEN y GFPEC e identificación por fluorescencia.....	46
<b>Figura 18.</b> Observación de VLPs filamentosas obtenidas con las proteínas TEVK y CP TEV.....	47
<b>Figura 19.</b> Morfología de VLPs filamentosas obtenidas con las proteínas TEVK y CP TEV.....	48
<b>Figura 20.</b> Controles positivos en ensayos de fagocitosis.....	50
<b>Figura 21.</b> Fagocitosis de antígenos favorecida por VLPs quiméricas.....	50

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Aspectos estructurales en algunos ejemplos de VLPs.....	6
<b>Tabla 2.</b> Secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas y secuencias de referencia.....	32
<b>Tabla 3.</b> Resultados del modelado <i>in silico</i> , similitud y proteínas utilizadas como molde.....	37
<b>Tabla 4.</b> Tamaño de las construcciones y fragmentos esperados por digestión con enzimas de restricción.....	38



## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

$\alpha$ -hélice: Estructura secundaria de proteínas.

°C: Grado centígrado.

$\lambda$ DE3: Fago recombinante que lleva el gen para la ARN polimerasa de T7 bajo control de lacUV5.

$\mu$ g: Microgramo.

$\mu$ l: Microlitro.

$\mu$ m: Micrómetro.

6His: Etiqueta de seis histidinas.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AIMV: Virus del Mosaico de la Alfalfa.

APCs: Células presentadoras de antígenos.

C: grupo carboxilo terminal.

CCMV: Virus del Moteado Clorótico del Caupí.

CD4+: Cluster de diferenciación 4 expresado en linfocitos T.

CD8+: Cluster de diferenciación 8 expresado en linfocitos T.

CP TEV: Proteína de la cápside del virus del grabado del tabaco.

CP: Proteína de la cápside.

CPMV: Virus del mosaico del caupí.

DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol.

DC: Célula dendrítica.

DO600: Densidad óptica medida a 600 nm.

*E. coli*: *Escherichia coli*.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína.

gaps: Vacíos entre secuencias debidas a una deleción o inserción.

GFP: Proteína Verde Fluorescente.

GFPEC: Proteína verde fluorescente con un dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada fusionado genéticamente a su extremo C terminal.

GFPEN: Proteína verde fluorescente con un dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada fusionado genéticamente a su extremo N terminal

GRAVY: Promedio general de hidropaticidad.

h: Hora.

HBc: nucleoproteína del Virus de Hepatitis B.

HBV: Virus de Hepatitis B.

HCV: Virus de Hepatitis C.

HPV: Virus del Papiloma Humano.

IMAC: Cromatografía de afinidad a metales inmovilizados

IPTG: isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido.

kDa: kilodalton.

l: Litro.

L1: Proteína del virus del papiloma humano que conforma ~80% de la cápside viral.

M2: Proteína de membrana del virus de influenza, proteína no estructural.

Medio LB: Medio de cultivo Luria Bertani.

mg: Miligramo.

MHC: Complejo Mayor de Histocompatibilidad.

MHC I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad tipo I.

mL: Mililitro.

mM: Milimolar.

N: grupo amino terminal.

NaCl: Cloruro de sodio.

Ni<sup>2+</sup>: Ión níquel (II).

nm: Nanómetro.

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos.

PapMV: Virus del Mosaico de la Papaya

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos.

PDB: Protein Data Bank.

pH: Potencial de hidrógeno.

pI: Punto isoeléctrico

PVX: Virus X de la papa.

PVY: Virus Y de la papa.

rpm: Revoluciones por minuto.

RSV: Virus Respiratorio Sincicial.

SDS PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

SFB: Suero fetal bovino.

SUVs: Vacunas subunitarias.

T7: Indicativo de origen del fago T7.

TEM: Microscopía electrónica de transmisión.

TEV: Virus del Grabado del Tabaco.

TEVK: Proteína quimérica compuesta por la proteína de la cápside del virus del grabado del tabaco con un dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada fusionado genéticamente a su extremo N terminal.

TEVK-GFPEC: Complejo formado por las VLPs TEVK a las cuales se unen las proteínas quiméricas GFPEC.

TEVK-GFPEN: Complejo formado por las VLPs TEVK a las cuales se unen las proteínas quiméricas GFPEN.

Th1: Tipo de linfocitos cuya función principal es la activación de macrófagos para la destrucción de patógenos intracelulares y estimular la inflamación.

TMV: Virus del Mosaico del Tabaco.

TMV: Virus del Mosaico del Tabaco.

Tris-HCl: Tris (hidroximetil)aminometano con ácido clorhídrico.

UV: Luz ultravioleta.

VC: Volumen de columna.

VIH-1: Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1.

VLP: Partícula tipo virus o partícula pseudovírica.

VLPs HPV: Partículas tipo virus del virus de papiloma humano.

VLPs Q $\beta$ : Partículas tipo virus del fago Q $\beta$ .

VLPs TEVK: Partículas tipo virus formadas por la proteína quimérica TEVK.

VPH 16: Virus del Papiloma Humano tipo 16.

WB: Western Blot.

## 1. RESUMEN

Las partículas pseudovíricas (VLPs) son nanopartículas que se autoensamblan tras la expresión de una o más proteínas virales. Las VLPs aprobadas como vacunas han demostrado ser seguras y eficaces en los seres humanos. Recientemente, se ha explorado el uso de estas partículas como plataformas presentadoras de antígenos. Los métodos más utilizados hasta el momento para obtener VLPs quiméricas incluyen la fusión genética y la conjugación química, sin embargo, es común que tales métodos provoquen problemas estéricos y de estabilidad de las VLPs o que limiten el tamaño del péptido que se puede acoplar a la nanopartícula, indicando que aún existe la oportunidad de desarrollar métodos alternativos para la obtención de VLPs quiméricas, como el uso de dominios de interacción proteica. Se ha demostrado previamente la utilidad de un dominio  $\alpha$ -hélice superenrollada para la encapsulación de proteínas en el interior de VLPs al formar un motivo de interacción de  $\alpha$ -hélice superenrollada.

A la fecha, se han estudiado VLPs procedentes de una variedad de virus, entre ellos las VLPs procedentes de potyvirus. Respecto a los potyvirus, se conoce que la proteína de la cápside (CP) contiene los extremos N y C terminales dispuestos de modo que se exponen en la superficie de partículas virales. Incluso se han llegado a fusionar secuencias en los extremos N y C terminales de cápsides potyvirales, sin interferir con el proceso de ensamblaje en VLPs.

En este trabajo, se insertó un dominio de interacción de  $\alpha$ -hélice superenrollada en el extremo N terminal de la CP del Virus del Grabado del Tabaco (TEV) para la obtención de VLPs quiméricas capaces de asociar antígenos en su superficie. Adicionalmente, se insertó un dominio de interacción complementario en la proteína verde fluorescente (GFP), que fue empleada como proteína reportera del acoplamiento de los dominios de interacción complementarios presentes en las VLPs y GFP a través de la formación del motivo de  $\alpha$ -hélice superenrollada. Para lo anterior, se generaron dos versiones de GFP insertando un dominio de interacción en el extremo N de la proteína en una versión (GFPEN) y en el extremo C en la otra (GFPEC). Se obtuvieron las tres proteínas quiméricas purificadas que conservan características similares a las nativas, se determinó la formación de VLPs y se evaluó su función acarreadora de antígenos en macrófagos murinos. Se comprobó la capacidad de autoensamblaje de las CP

quiméricas así como su capacidad para favorecer la fagocitosis localizada de los antígenos acoplados.

## 2. INTRODUCCIÓN

La vacunación ha sido hasta la actualidad el método más eficaz para el control y prevención de enfermedades infecciosas. A medida que el desarrollo de vacunas se incrementa, aumenta también la necesidad de recurrir a conceptos modernos y al diseño racional de las mismas. De tal modo, se requieren adyuvantes y nuevos sistemas de suministro que aumenten la inmunogenicidad; actualmente, la nanotecnología ofrece la oportunidad de diseñar partículas que varían en composición, tamaño, forma y propiedades de superficie, para su aplicación en el campo de la medicina (Plotkin 2005) .

Las partículas pseudovíricas (VLPs) son nanopartículas consideradas como una clase de vacunas subunitarias, es decir, basadas en componentes antigénicos de patógenos. La principal característica de las VLPs es su capacidad de autoensamblaje tras la expresión de una o más proteínas virales, asemejando el virus original. A diferencia de los virus no son infecciosas y no se replican, ya que están desprovistas del material genético (Chackerian 2007) (Roldão, y otros 2010).

Diversas VLPs se han evaluado como vehículos acarreadores de antígenos con la finalidad de favorecer la respuesta inmune contra el antígeno acoplado al presentarlo de manera agrupada y repetitiva en la superficie de las partículas. En este sentido, Tissot y colaboradores reportaron la fusión de la proteína M2 al extremo N de la proteína de la cápside del bacteriófago AP205, obteniendo VLPs quiméricas que dieron como resultado una fuerte respuesta de anticuerpos específicos de M2 tras la inmunización (Tissot, y otros 2010). Existe una variedad VLPs quiméricas desarrolladas para la estimulación de la respuesta inmune contra antígenos de distinto origen y se obtienen generalmente por fusión genética o conjugación química (Chackerian 2007) (Roldão, y otros 2010) (Grgacic y Anderson 2006). Sin embargo, frecuentemente estos métodos de acoplamiento de antígenos a VLPs presentan problemas estéricos y de estabilidad, limitando el tamaño del antígeno que se acopla a la partícula.

La proteína de la cápside (CP) del Virus del Grabado del Tabaco (TEV) (CP TEV) está ampliamente estudiada, conociéndose la función estructural de algunos residuos altamente conservados, los cuales son importantes para el autoensamblaje. Además,

se ha comprobado que, de forma similar a otros potyvirus, la CP TEV cuenta con extremos N terminales expuestos en la superficie de partículas infecciosas, de modo que estos residuos pueden aprovecharse para el acoplamiento de antígenos (Shukla, y otros 1988) (Kalnciema, y otros 2012) (Manuel Cabrera, y otros 2012). Además, se ha evidenciado que la inmunización de ratones empleando TEV induce respuestas tanto humorales como celulares (Manuel Cabrera, y otros 2012).

En trabajos recientes, se ha comprobado que el uso de secuencias cortas de aminoácidos o de dominios  $\alpha$ -hélice superenrollada complementarios permiten la asociación entre CPs y proteínas por medio de interacciones electrostáticas e hidrofóbicas (Minten, y otros 2009) (Leclerc 2010) (Minten, y otros 2011).

Con base en la relevancia de las VLPs como vacunas y las dificultades observadas para el acoplamiento de antígenos, en este trabajo se insertó un dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada en la CP TEV para la obtención de VLPs quiméricas y otro dominio en la proteína verde fluorescente (GFP) para el acoplamiento por medio de un motivo de  $\alpha$ -hélice superenrollada formado entre ambas  $\alpha$ -hélices. Se generaron dos versiones de GFP, insertando un dominio de interacción en el extremo N de la proteína en una versión y en el extremo C en la segunda. Se obtuvieron las tres proteínas quiméricas purificadas que conservan características similares a las nativas, se evaluó la formación de VLPs y su función acarreadora de antígenos en macrófagos murinos.



### **3. ANTECEDENTES**

#### **3.1 VLPs**

Las partículas pseudovíricas también llamadas partículas tipo virus (VLPs, por sus siglas en inglés Viral Like Particles), son estructuras multiméricas compuestas por una o más proteínas virales estructurales, generalmente proteínas de la cápside, las cuales tienen la propiedad de auto ensamblarse e imitar la conformación del virus del que derivan. A diferencia de los virus, las VLPs no son infecciosas y no se replican ya que están desprovistas del material genético (Chackerian 2007) (Roldão, y otros 2010).

En los últimos años, se ha producido una diversidad de VLPs compuestas por proteínas de distinto origen, entre ellas, VLPs basadas en la nucleoproteína del Virus de Hepatitis B (HBV), nucleoproteína del Virus de Hepatitis C (HCV), proteína L1 del Virus del Papiloma Humano (HPV), Hemaglutinina y proteína M1 de Virus de influenza A, Glicoproteína (GP) y proteína VP40 del Virus del Ébola (Grgacic y Anderson 2006) (Roldão, y otros 2010).

La diversidad de formas y tamaños virales se ve reflejada en la morfología observada en las VLPs, pudiendo generarse partículas icosaédricas (o esféricas) como las del Virus de influenza e incluso estructuras helicoidales como las formadas por el Virus del Mosaico del Tabaco (TMV) o el fago M13 (Mateu 2016).

Basados en los componentes que integran la estructura, existen distintos tipos de VLPs, pudiendo encontrarse VLPs compuestas por una sola o múltiples proteínas y que a su vez pueden tener o no envolturas lipídicas. Algunos ejemplos se muestran en la Tabla 1 (Roldão, y otros 2011). Las VLPs no envueltas generalmente se componen por uno o más componentes del patógeno, por otro lado, las VLPs envueltas muestran una estructura más compleja, consisten en la membrana de la célula huésped (una envoltura) con antígenos diana integrados que se muestran en la superficie externa de la partícula (Kushnir, Streatfield y Yusibov 2012).

**Tabla 1. Aspectos estructurales en algunos ejemplos de VLPs.**

<b>Virus de procedencia</b>	<b>Proteínas recombinantes</b>	<b>Envuelta</b>	<b>Estructura</b>	<b>Referencia</b>
<b>Bacteriófagos</b>				
AP205	Proteína de cubierta CP3	No	~20 nm de diámetro	(Brune, y otros 2016) (Tissot, y otros 2010)
Q $\beta$	Proteína de cubierta	No	25 nm de diámetro	(Maurer, y otros 2005)
<b>Virus animales</b>				
HBV	Antígeno de superficie	Si, tres proteínas	22 nm de diámetro	(Keating y Noble S. 2003)
HBV	Antígeno nuclear	No	34 nm de diámetro	(Jegerlehner, y otros 2002)
HIV	Proteína GAG	Si, dos proteínas	108-138 nm de diámetro	(Sakuragi, y otros 2002)
HPV	Proteína mayor de la cápside L1	No	30-50 nm de diámetro	(Einstein, y otros 2009)
Influenza A virus (H1N1)	HA, NA, M1, M2	Si, tres proteínas	80-120 nm de diámetro	(Matassov, Cupo y Galarza 2007)
Poliovirus	VP0, VP1, VP3	No	27 nm de diámetro	(Brautigam, Snezhkov y Bishop 1993)
Virus Ebola	Glicoproteína y VP40	Si, dos proteínas	70 nm de diámetro, 800-1500 nm de longitud	(Sun, Carrion y Ye 2009)
<b>Virus vegetales</b>				
CCMV	Proteína de la cápside	No	~28 nm de diámetro	( Phelps, y otros 2007) (Minten, y otros 2009) (Minten, y otros 2011)
PapMV	Proteína de la cápside	No	201 $\pm$ 80 nm de longitud	(Denis, y otros 2007)
PVY	Proteína de cubierta	No	11 nm de diámetro 400-800 nm de longitud	(Kalnciema, y otros 2012)
TEV	Proteína de la cápside	No	$\geq$ 12 nm de diámetro, $\geq$ 730 nm de longitud	(Voloudakis, y otros 2004) (Manuel Cabrera, y otros 2016)

HBV: Virus de hepatitis B; HIV: Virus de Inmunodeficiencia Humana; HPV: Virus del Papiloma Humano; CCMV: Virus del Mosaico Clorótico del Cauquí; PapMV: Virus del Mosaico de la Papaya; PVY: Virus Y de la Papa; TEV: Virus del Grabado del Tabaco.

Las estructuras de las VLPs pueden adquirir diversos tamaños (Tabla 1), mientras que algunos autores consideran partículas de hasta 1000 nm como nanopartículas (Smith, Simon y Baker Jr 2013). En la distinción entre nanopartículas y micropartículas, se acepta que algo inferior a 100 nm se encuentra en el rango "nano" y cualquier partícula superior a 100 nm se considera una "micropartícula", por lo tanto, aquellas VLPs como

las derivadas de virus filamentosos pueden alcanzar tamaños mayores a 800 nm podrían considerarse micropartículas (Wilson, Xiang y Plebanski 2017).

En cuanto a la obtención de VLPs, estas pueden obtenerse expresando las proteínas de manera recombinante. Para lo anterior, pueden aprovecharse diversos sistemas de expresión como células de mamífero, células de insecto, bacterias, levaduras o plantas (Chackerian 2007). La elección del sistema de expresión depende en gran medida, de la estructura y función de la VLP resultante, así como de la complejidad del proceso de producción.

### **3.2 Propiedades inmunogénicas de las VLPs**

La inmunogenicidad se considera como la capacidad que tiene una molécula o sustancia para provocar una respuesta inmune (Mahanty, Prigent y Garraud 2015). Moléculas biológicas de los patógenos tales como oligonucleótidos, polisacáridos y proteínas tienen características antigénicas por lo que se consideran patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Smith, Simon y Baker Jr 2013).

En el caso de los virus, generalmente el patrón repetitivo que desencadena una respuesta inmunológica es el material genético. En algunos casos, en virus no envueltos se ha observado que la estructura altamente repetitiva de la cápside puede ser reconocida y activar células del sistema inmune como: macrófagos, células dendríticas (CDs) y linfocitos B (Kushnir, Streatfield y Yusibov 2012). De forma similar a los virus, la naturaleza particulada de las VLPs expone epítomos en su superficie en una conformación repetida que favorece la detección y captación por las células presentadoras de antígenos (CPAs), los epítomos son degradados y transportados por los ganglios linfáticos para la subsecuente activación de linfocitos T, induciendo así una potente respuesta inmune (Chackerian 2007) (Jennings y Bachmann 2008).

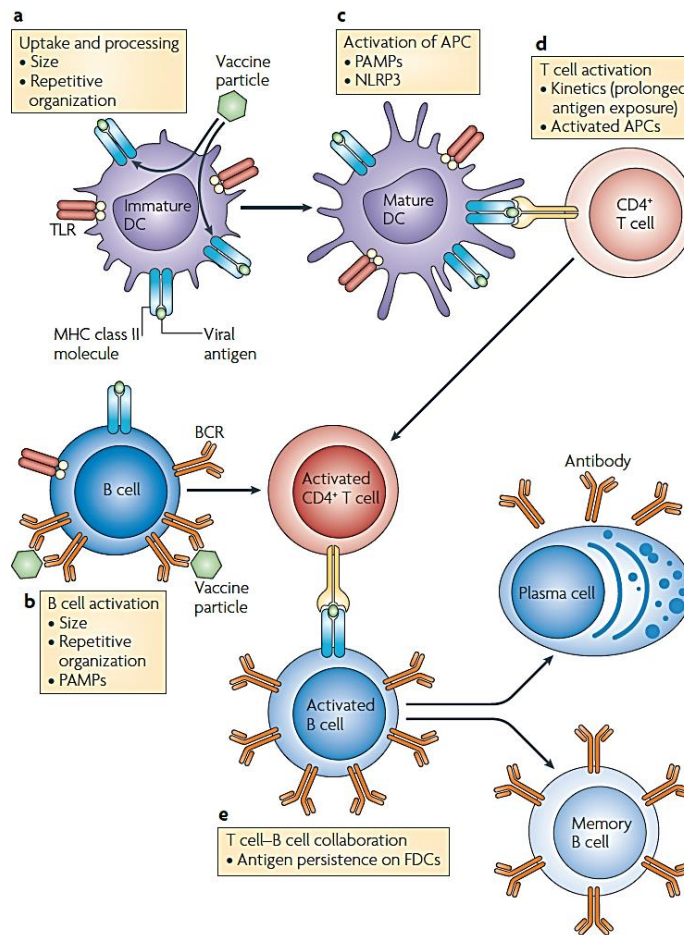
El tamaño de los antígenos es un factor importante para la captación por CPAs además de otras propiedades como la forma, carga superficial, hidrofobicidad e interacción con un receptor. Los antígenos particulados como los virosomas, las VLPs y antígenos preparados mediante nanotecnología en otro tipo de partículas, tienen superficies

grandes que conducen a una mejor interacción con CPAs en comparación con proteínas solubles (Bachmann y Jennings 2010). Partículas con tamaño en el rango de 10-200 nm son endocitadas por CPAs y transportadas hacia los vasos linfáticos o bien, pueden desplazarse desde el espacio intersticial hacia los nódulos linfáticos y captarse eficientemente a linfocitos B y T o CPAs residentes del nódulo linfático (Chen y Lai 2013). En cambio, las partículas que son de 500 nm-1 µm son demasiado grandes por lo que son transportadas al nódulo linfático después de la captación por las CDs (Bachmann y Jennings 2010).

Al igual que sus virus de origen, las VLPs tienen un tamaño de partícula ideal para su captación por CDs y macrófagos, para el posterior procesamiento de antígenos. De acuerdo con Link y colaboradores, las VLPs pueden captarse eficientemente por células dendríticas foliculares en ausencia de inmunidad, así también con ayuda de anticuerpos IgM y moléculas del complemento las partículas pueden captarse por linfocitos B. Además, el tamaño y la estructura repetitiva son factores críticos para la presentación de antígenos a linfocitos B ( Link, y otros 2012).

Al ser una VLP una estructura altamente repetitiva, favorece la exposición de una alta densidad de epítomos en su superficie, por lo tanto, la captación de una única VLP suministra numerosos epítomos en la maquinaria de procesamiento para su posterior presentación vía MHC. Los péptidos producto de la degradación se cargan en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y posteriormente se transportan a la superficie celular para la estimulación de linfocitos T CD4+ (Figura 1) (Bachmann y Jennings 2010). Se ha reportado que algunos tipos de VLP como las de HPV y del virus ébola inducen la maduración de CDs, dando lugar a la producción de moléculas coestimuladoras, citocinas, MHC de clase I y II, induciendo respuestas de linfocitos T de tipo Th1 (incluyendo activación de linfocitos T CD8+) (Lenz, y otros 2001) (Bosio, y otros 2004). Además, se conoce que a través del proceso de presentación cruzada, los antígenos vacunales pueden presentarse por moléculas del MHC de clase I para activar linfocitos T CD8+, pero se ha observado que los antígenos proteicos solubles se presentan de forma ineficiente en comparación con antígenos particulados de tamaño similar o mayor que los virus (Harding y Song

1994). Por lo tanto, la naturaleza particulada de las VLPs facilita la detección y absorción por CPAs, resultando relevantes para la inducción óptima de respuestas inmunes mediadas por linfocitos T, que son células particularmente importantes para combatir tanto infecciones por virus, como patógenos no virales y cánceres (Chen y Lai 2013).



**Figura 1. Pasos clave durante la generación de respuestas inmunes protectoras.** a) El procesamiento de antígenos se facilita si los antígenos son particulados y tienen una organización superficial repetitiva, lo que aumenta la fagocitosis y la capacidad de activar el complemento y reclutar otras moléculas del sistema inmune humoral innato. b) La activación de los linfocitos B también se ve facilitada por antígenos que tienen una organización superficial repetitiva (a través del entrecruzamiento del receptor de células B (BCR) y la activación del complemento) y que contienen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). c) La activación de células presentadoras de antígenos (CPAs) se facilita mediante el reconocimiento de PAMPs por receptores Toll like (TLR), otros receptores de reconocimiento de patrones o por otros mecanismos. d) La activación de las células T se facilita por la presencia prolongada de antígeno a través de adyuvantes formadores de depósitos o por regímenes de vacunación. e) La colaboración de linfocitos T-linfocitos B es esencial para la generación de células plasmáticas y linfocitos B de memoria. DC: célula dendrítica (Bachmann y Jennings 2010).

### 3.3 VLPs como vacunas

Las vacunas han tenido un papel clave en el aumento de la esperanza de vida humana ya que es el método más eficaz para el control y prevención de enfermedades infecciosas. Recientemente, se han desarrollado vacunas para el tratamiento de enfermedades no infecciosas, como la vacuna Sipuleucel-T (Provenge<sup>®</sup>) diseñada para tratar el cáncer de próstata avanzado (Anassi y Ndefo 2011).

Las primeras vacunas se basaron en patógenos vivos atenuados como las vacunas contra polio (Sabin), viruela o rabia. En busca de vacunas más seguras, se desarrollaron las vacunas basadas en patógenos inactivos, entre ellas las vacunas contra Polio (Salk), cólera, influenza (Plotkin 2005).

Hoy en día, los avances en ingeniería genética y el conocimiento más amplio de la protección inmunológica, han llevado al desarrollo de vacunas subunitarias (SUVs), es decir, basadas en componentes específicos de patógenos. Al conformarse por proteínas virales estructurales, las VLPs clasifican como SUVs. Además, al carecer de material genético, así como de capacidad infectiva y de replicación, las VLPs son candidatos a vacunas biológicamente más seguras, evitando el riesgo de reversión de virulencia que pudiera presentarse en vacunas basadas en virus atenuados (Bachmann y Jennings 2010) (Kushnir, Streatfield y Yusibov 2012). Adicionalmente, las vacunas basadas en VLPs permiten la diferenciación entre individuos vacunados e infectados con el virus patógeno mediante ensayos de detección de serología positiva a proteínas que no forman parte de la VLP (Park, y otros 2014).

Con el avance en tecnología del ADN recombinante y conociendo las características atractivas de las VLPs como inmunógenos, en los últimos años ha crecido el número de estudios y desarrollos para la generación de vacunas basadas en VLPs. En el mercado existen vacunas basadas en VLPs que han demostrado ser seguras y eficaces en los seres humanos. Ejemplos de estas vacunas son las diseñadas para prevenir la Hepatitis B, entre ellas se encuentran; GenHevac-B<sup>™</sup>, Engerix-B<sup>™</sup>, Enivac-B<sup>™</sup>, Recombivax HB<sup>®</sup>. Otras vacunas profilácticas son Gardasil<sup>®</sup> y Cervarix<sup>®</sup> dirigidas a la prevención de infecciones por el HVP (Grgacic y Anderson 2006) (Kushnir, Streatfield y Yusibov 2012).

Diversas VLPs se han estudiado como vacunas contra enfermedades infecciosas y cáncer, incluso se han usado satisfactoriamente para exponer auto antígenos orientándose a moléculas implicadas en enfermedades crónicas como la hipertensión, la enfermedad de Alzheimer y la artritis reumatoide (Smith, Simon y Baker Jr 2013). Con estos fines existen numerosos trabajos en los que se plantea el uso de VLPs como plataformas a las que se unen componentes adicionales procedentes de otros patógenos u otros péptidos de interés (Chackerian 2007).

### **3.4 VLPs quiméricas**

Las atractivas características de las VLPs han llevado al estudio de su utilidad como andamios acarreadores de antígenos y epítomos. Esta aplicación se orienta a la generación de respuesta inmune contra antígenos o epítomos de origen distinto al virus del que procede la VLP, generando así VLPs quiméricas (Grgacic y Anderson 2006). De este modo, se han obtenido vehículos capaces de exponer antígenos acoplados que derivan de otros patógenos e incluso péptidos de interés en la inmunidad del cáncer (Brune, y otros 2016). La utilidad de las VLPs quiméricas como vacunas se ha evidenciado en varios trabajos, resaltando por ejemplo la utilización VLPs del bacteriófago Q $\beta$  como acarreador de nicotina, acoplado el hapteno de forma covalente a las VLPs obtenidas previamente por expresión en *E. coli* (Maurer, y otros 2005).

Algunos antígenos solubles, como la proteína M2 del virus de influenza A, inducen una pobre respuesta inmune, una alternativa para incrementar la respuesta es presentarlo en estructuras repetidas. Las VLPs obtenidas al fusionar la proteína M2 al extremo N de la proteína de cubierta del bacteriófago AP205, inducen una fuerte respuesta de linfocitos B y apoyan la noción de que cualquier antígeno en una matriz altamente organizada estimula eficazmente la respuesta de los anticuerpos (Tissot, y otros 2010). Grgacic y Anderson recopilaron varios ejemplos de VLPs en las que se han insertado epítomos y antígenos foráneos, por mencionar algunas, las VLPs de la nucleoproteína del virus de Hepatitis B (HBc), VLPs del HVP y VLPs del fago Q $\beta$ .

Además de virus que infectan mamíferos y bacterias, durante los últimos años, CP de varios virus que infectan plantas se han producido con éxito para exponer una amplia gama de antígenos de mamíferos. Por ejemplo, las partículas quiméricas formadas por las CP de virus del mosaico del tabaco (TMV) fusionadas a epítomos de *Plasmodium falciparum*; virus del mosaico de la alfalfa (AIMV) presentando epítomos de virus de la rabia, VIH-1 y virus respiratorio sincitial (RSV); virus del mosaico del caupí (CPMV) que muestra epítomos del VIH-1, VPH16, *Bacillus anthracis* y *P. falciparum*; y el virus X de la patata (PVX) que lleva epítomos de VIH-1 y virus de la influenza para estimular respuesta inmune específica (Chackerian 2007) (Kushnir, Streatfield y Yusibov 2012). Las VLPs quiméricas basadas en virus que infectan plantas se han desarrollado bajo la premisa de que los virus de origen vegetal no se replican en células animales, por lo tanto representan una ventaja sobre la posible inmunidad preexistente contra VLPs procedentes de virus que infectan animales o humanos (Kalnciema, y otros 2012). En cambio, la naturaleza particulada de su CP es similar al de otras plataformas para estimular la respuesta de células del sistema inmune, por lo que las VLPs derivadas de virus vegetales resultan atractivas como andamios acarreadores de antígenos y han demostrado utilidad para la generación de vacunas (Chen y Lai 2013).

### **3.5 Métodos de obtención de VLPs quiméricas**

Hasta el momento, los dos métodos comúnmente utilizados para el acoplamiento de péptidos o proteínas en VLPs son la fusión genética y la conjugación química por enlaces covalentes. A través de estas técnicas se obtienen las partículas conocidas como VLPs quiméricas (Roldão, y otros 2010).

En la obtención de quimeras producidas por fusión genética, se realiza la clonación de la secuencia que codifica los epítomos en los genes que codifican el autoensamblaje de polipéptidos a VLPs. Tras el montaje de subunidades híbridas, los epítomos introducidos se presentan de una manera repetitiva y ordenada, a relativamente alta densidad (1 copia por cada subunidad que conforma la VLP) e idealmente con la accesibilidad y la conformación óptima (Jennings y Bachmann 2008). Sin embargo, debido a problemas estéricos, el tamaño de los péptidos capaces de incorporarse en



la partícula sin interferir con el ensamblaje de la cápside es bastante limitado y en ocasiones el plegamiento del antígeno asociado es problemático, siendo casi imposible que adopte una estructura cuaternaria (Kratz, Böttcher y Nassal 1999). Existen excepciones como la reportada por Kalnciema y colaboradores usando la CP del virus Y de la papa (PVY) como portadora de secuencias proteicas de hasta 71 aminoácidos por fusión genética en el extremo N de la CP (Kalnciema, y otros 2012).

Cuando el antígeno de interés se inserta adyacente a los sitios altamente inmunogénicos de VLPs, la respuesta inmune es mejor al incluir espaciadores que rodean la inserción, sin embargo, es crítico el tamaño del inserto que permita la correcta disposición tridimensional de los epítopes propios de la VLP y a su vez la correcta interacción entre los sitios comprometidos en el autoensamblaje (Kratz, Böttcher y Nassal 1999).

Para hacer frente a este problema, se ha experimentado con el acoplamiento de antígenos o epítotos a VLPs por medio de técnicas químicas como 1) reacciones de acilación de los grupos amino de las cadenas laterales de lisina y extremos N terminal, 2) alquilación de los grupos sulfhidrilo de cisteína y 3) activación de residuos de ácido carboxílico. El método más utilizado para la unión a VLPs es a través de reactivos de conjugación heterobifuncionales que contienen dos grupos reactivos distintos que se acoplan a objetivos funcionales distintos: uno en la VLP (comúnmente grupos amino o sulfhidrilo) y el otro en el antígeno (Roldão, y otros 2010). Aunque la conjugación química representa la estrategia más efectiva actualmente disponible para la funcionalización selectiva con orientación controlada de nanopartículas, se han observado problemas de estabilidad en bioconjugados obtenidos por este método debido a la difícil estimación de la capacidad de carga de las CP y el difícil control de la reacción de acoplamiento. El método de acoplamiento químico permite la unión de epítotos e incluso antígenos completos en la superficie de VLPs y partículas virales. Sin embargo, se pone de manifiesto que los grupos reactivos disponibles implican una variable importante en el número de péptidos a acoplar. Este hecho se refleja al comparar los resultados reportados por Murer y colaboradores, donde se encontraron 3.25 moléculas de nicotina por monómero de CP en VLPs Q $\beta$  en comparación con un

epítope o antígeno expuesto por fusión genética. En consecuencia, la variabilidad en cuanto al número de grupos reactivos por CP en diversas VLPs representa una fuente de inestabilidad de los bioconjugados resultantes (Guerrero Rodríguez, y otros 2014) (Smith, y otros 2006).

### **3.6 VLPs del Virus del grabado del tabaco**

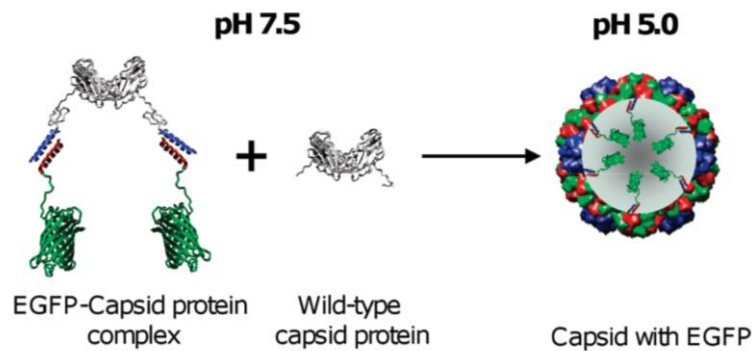
Los miembros del género *Potyvirus* se caracterizan por formar partículas flexibles, no envueltas, en forma de varilla que miden de 680 a 900 nm de largo y entre 11 a 15 nm de ancho. Las CP de *Potyvirus* poseen características interesantes que ofrecen potencial para su uso como portadores de antígenos: los extremos N y C terminales están expuestos en la superficie de las partículas infecciosas y presentan los epítotos más inmunogénicos (Shukla, y otros 1988).

El virus del grabado del tabaco (TEV) es un miembro de la familia *Potyviridae*. De acuerdo con estudios realizados recientemente, se conoce que la cápside del TEV presenta el extremo N-terminal en la superficie de las partículas virales, quedando disponibles para el acoplamiento de antígenos. Se comprobó también que las partículas virales TEV inducen respuesta de linfocitos T y la producción de anticuerpos al administrarse en ratones sin agregar adyuvantes (Manuel Cabrera, y otros 2012). La cápside de los virus filamentosos se compone del montaje de hasta 2,000 copias de la proteína de la cápside (Shukla, Frenkel y Ward 1991). A diferencia de los virus esféricos, como el HPV que cuenta con 360 monómeros de la proteína L1 en su cápside (Finnen, y otros 2003) y del bacteriófago Q $\beta$  que cuenta con 180 monómeros en su cubierta (Maurer, y otros 2005), el número de monómeros que componen la cápside de potyvirus representan numerosos sitios disponibles para el acoplamiento de antígenos. En lo que refiere al auto ensamblaje de la CP en VLPs, se ha evidenciado que la remoción de los primeros residuos del extremo N disminuyen la flexibilidad y el diámetro de las VLPs resultantes; en el mismo estudio se observó que la mutación del residuo Asp198 altera la estructura secundaria y afecta la capacidad de polimerización (Voloudakis, y otros 2004).

### 3.7 El dominio $\alpha$ -hélice como motivo de oligomerización en proteínas

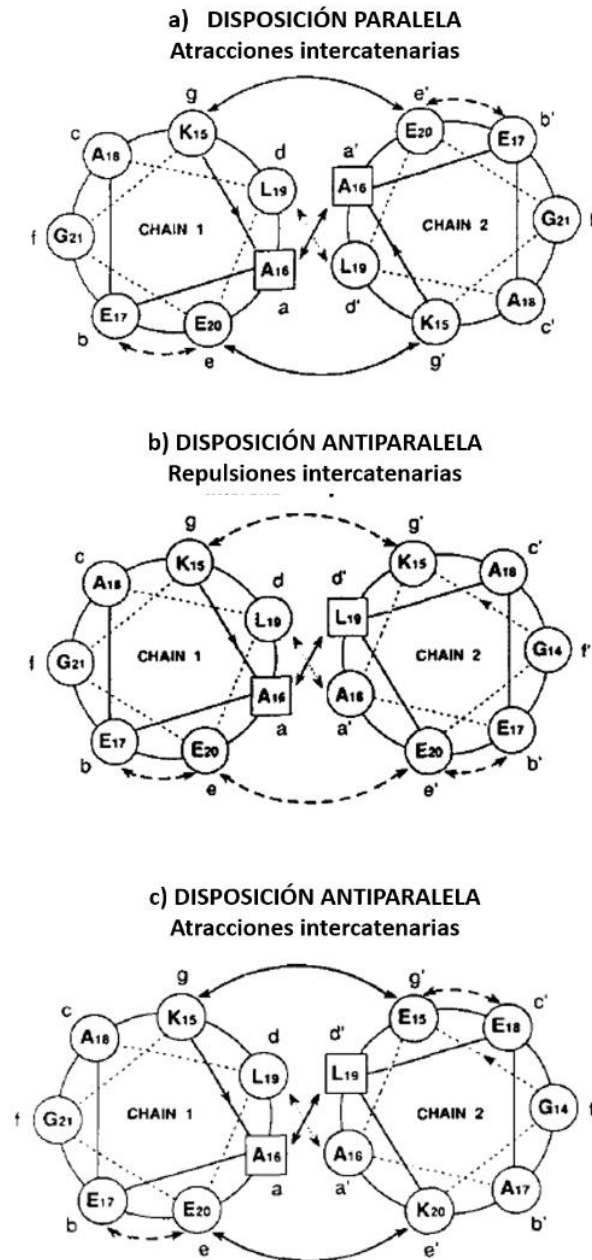
De acuerdo a Minten y colaboradores, el dominio  $\alpha$ -hélice superenrollada puede utilizarse para la encapsulación de secuencias proteicas en el interior de VLPs, de modo que los extremos N-terminales de la CP de Virus del Mosaico Clorótico del Cauquí (CCMV) se utilizaron para la integración genética del dominio de interacción y posterior acoplamiento de proteínas con dominios complementarios (Figura 2). La elección de un método de unión no covalente, elimina la necesidad de usar reacciones químicas, las cuales dificultan la selectividad para unir dos proteínas (Minten, y otros 2009).

La  $\alpha$ -hélice superenrollada es un dominio que forma y representa uno de los principales motivos de oligomerización en las proteínas. Su rasgo característico es un patrón de repetición de siete residuos, denominado  $(abcdefg)_n$ . Los aminoácidos que componen la  $\alpha$ -hélice superenrollada son principalmente apolares y se alinean cuando la secuencia del péptido se pliega en la conformación helicoidal. La tira hidrófoba lateral formada posteriormente a un lado de la espiral enrollada, es la principal fuerza impulsora para el autoensamblaje de los dos dominios y la estabilidad de los motivos de  $\alpha$ -hélice superenrollada se debe principalmente a un núcleo hidrofóbico formado por estas cadenas laterales (Burkhard, Stetefeld y Strelkov 2001).



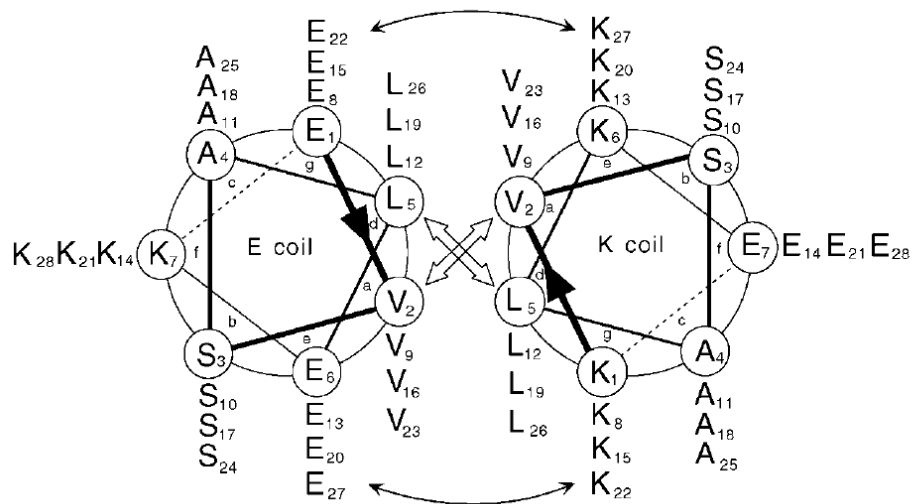
**Figura 2. Representación esquemática de la interacción entre dominios  $\alpha$ -hélice superenrollada en la encapsulación de GFP.** El complejo de GFP-proteína de la cápside se mezcla con proteína de la cápside nativa a pH 7,5 y posteriormente se dializa a pH 5,0 para inducir la formación de cápside (Minten, y otros 2009).

Los dominios de interacción de  $\alpha$ -hélice superenrollada ofrecen características atractivas para el diseño de proteínas ya que la secuencia de aminoácidos que conforma la héptada genera interacciones hidrofóbicas (entre residuos **a** y **d**) y electrostáticas (principalmente entre residuos **e** y **g**) que juegan un papel importante en la estabilidad y especificidad entre hélices. Cabe puntualizar que además de las interacciones hidrofóbicas características, la dimerización depende en gran medida de las interacciones electrostáticas que pueden generarse entre dominios y que están asociadas a un acoplamiento paralelo o antiparalelo. La estabilidad de los acoplamientos, ya sean paralelos o antiparalelos, se ve afectada por la disposición de residuos cargados (por ejemplo de ácido glutámico o lisina) en las posiciones **e** y **g** de cada dominio. Además, residuos con la misma carga en estas posiciones producirán fuerzas repulsivas que disminuyen la estabilidad del motivo formado mientras que residuos con carga contraria favorecen la interacción (Figura 3) (Monera, y otros 1993).



**Figura 3. Representación transversal de  $\alpha$ -hélices superenrolladas en disposición paralela y antiparalela unidas por puentes disulfuro.** Las atracciones electrostáticas se indican con flechas sólidas y las repulsiones electrostáticas se indican como flechas discontinuas. En las alineaciones paralelas y antiparalelas, las direcciones de propagación de la cadena son iguales y opuestas, respectivamente. Los residuos hidrófobos en las posiciones "a" y "a'" están empaquetados entre los dominios dispuestos en forma paralela. **a)** Motivo  $\alpha$ -hélice superenrollada paralelo (homodimérico) con atracciones electrostáticas intercatenarias (residuos g y e). **b)** Motivo  $\alpha$ -hélice superenrollada antiparalelo (heterodimérico) con repulsiones electrostáticas intercatenarias. **c)** Motivo  $\alpha$ -hélice superenrollada antiparalelo (heterodimérico) con atracción electrostática intercatenarias utilizado para la comparación con **b)**. Los núcleos hidrofóbicos de los dos motivos  $\alpha$ -hélice superenrollada antiparalelos son idénticos (Monera, y otros 1993).

De acuerdo con Minten y colaboradores, la elección de  $\alpha$ -hélices heterodiméricas evitan el problema de autodimerización entre la CP o las proteínas de interés. Sin embargo, cabe mencionar que la formación de heterodímeros se favorece cuando se colocan residuos con la misma carga (ácido glutámico o lisina) en las posiciones **e** y **g** de una héptada y residuos con carga contraria a estos en las mismas posiciones de la héptada correspondiente al dominio complementario. Litowski y Hogdes muestran un modelo en el que una  $\alpha$ -hélice denominada E contiene todos los residuos de ácido glutámico en las posiciones **e** y **g**, y la  $\alpha$ -hélice denominada K contiene todos los residuos de lisina en estas posiciones (Figura 4), esta estrategia favorece la heterodimerización en forma paralela o antiparalela (Litowski y Hodges 2002).



**Figura 4. Representación transversal de un heterodímero E4/K4.** La cadena peptídica se propaga desde el extremo NH<sub>2</sub> al extremo COOH. Se muestran dos  $\alpha$ -hélices denominadas E4 (izquierda) y K4 (derecha). La cadena peptídica se propaga desde el grupo -NH<sub>2</sub> hasta el grupo -COOH. Las interacciones hidrofóbicas entre  $\alpha$ -hélices se indican con flechas anchas. Las flechas delgadas denotan los cuatro pares de atracciones electrostáticas entre cadenas en cada lado del núcleo hidrofóbico (por ejemplo, Glu22-Lys27, Glu15-Lys20, etc.) (Litowski y Hodges 2002).

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La investigación y desarrollos relacionados con el uso de VLPs quiméricas como sistemas acarreadores de péptidos y proteínas se ha extendido para su aplicación biotecnológica y farmacéutica, aprovechando sus utilidad en el desarrollo de vacunas profilácticas o de terapia. Las estrategias empleadas hasta el momento para la obtención de VLPs quiméricas representan varios inconvenientes que dificultan la explotación de VLPs para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades. El método de fusión genética implica realizar un diseño completo para cada VLP quimérica esperando el adecuado plegamiento y autoensamblaje, comprometiendo así aspectos críticos tanto en la VLP como en el antígeno a acarrear. Por otro lado, al conjugar antígenos a VLPs por medio de reacciones químicas se requieren numerosos pasos para obtener VLPs quiméricas. En virtud de que los métodos empleados al momento involucran variantes de proceso que ponen en riesgo la obtención y estabilidad de VLPs quiméricas, se requiere el diseño de modelos que permitan obtener antígenos correctamente plegados, VLPs ensambladas y simplificar el proceso de acoplamiento, procurando un menor riesgo en la estabilidad de las partículas obtenidas.

En este trabajo se propuso una alternativa para resolver los problemas técnicos asociados a las dos estrategias ya mencionadas. Se planteó la decoración de VLPs únicamente por mezcla de las mismas con el antígeno de interés, ensamblándose mediante motivos de  $\alpha$ -hélice superenrollada. Su versatilidad se encuentra en la expresión independiente de proteínas quiméricas, tanto la CP como el antígeno de interés, permitiendo su plegamiento independiente para su posterior ensamblaje. El modelo evita el uso de reacciones químicas y plantea reducir los tiempos y costos para la obtención de complejos VLP-antígeno al contar con VLPs quiméricas acarreadoras de una diversidad de antígenos.

## 5. JUSTIFICACIÓN

La utilidad de las vacunas subunitarias representa una alternativa potencialmente más segura en comparación con las vacunas basadas en patógenos vivos o atenuados. Además, resultan ventajosas por la flexibilidad en la creación de quimeras que puedan dirigirse tanto a la prevención de enfermedades infecciosas como no infecciosas. Las VLPs quiméricas se obtienen generalmente por fusión genética o por conjugación química. Aunque la fusión genética ha sido exitosa en numerosos casos, en muchos otros se presentan problemas estéricos, limitando el tamaño de los péptidos capaces de incorporarse en la partícula sin comprometer el ensamblaje de la cápside y el correcto plegamiento del antígeno asociado. Por otro lado, el método de conjugación química permite el acoplamiento de secuencias antigénicas más largas (antígenos completos) pero se han observado problemas de estabilidad en los bioconjugados y difícil control de la reacción de acoplamiento. Para aplicación vacunal es necesario que los enfoques emergentes para la obtención de partículas quiméricas sean versátiles y multi-escala, dirigidos a la producción industrial. Por lo tanto, es importante realizar el diseño racional de las moléculas, contemplando los métodos de obtención de las proteínas quiméricas, métodos de purificación y ensamblaje.

En este estudio, se propuso el uso de un dominio de interacción de  $\alpha$ -hélice superenrollada para la generación de VLPs quiméricas acarreadoras de antígenos. El modelo consiste en el ensamblaje de VLPs quiméricas a través la expresión de la CP TEV que contiene un dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada y la unión de la Proteína Verde Fluorescente (GFP) como antígeno indicador en la superficie de las partículas CP TEV quiméricas por la unión de dominios complementarios de  $\alpha$ -hélice superenrollada, generando un bioconjugado obtenido únicamente por mezcla de los componentes y que permite el monitoreo de su fagocitosis por macrófagos.

Este modelo representa una posible solución a los problemas de plegado, tamaño de péptido a acarrear y evita reacciones químicas de acoplamiento. Para futuras aplicaciones, la expresión independiente de la proteína que compone la cápside y el antígeno representa una ventaja en cuanto a la incompatibilidad del sistema de expresión cuando el antígeno requiere complejas modificaciones postraduccionales.



## **6. HIPÓTESIS**

La interacción de un antígeno con VLPs quiméricas del Virus del Grabado del Tabaco por medio de dominios  $\alpha$ -hélice superenrollada genera bioconjugados que favorecen la fagocitosis.

## **7. OBJETIVOS**

### **7.1 Objetivo general**

Generar bioconjugados que consisten en VLPs quiméricas y antígenos completos mediante la incorporación de dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada y evaluar la respuesta fagocítica de macrófagos *in vitro*.

### **7.2 Objetivos específicos/particulares**

1. Evaluar la expresión y purificación de la proteína de la cápside del virus del grabado del tabaco y de la proteína verde fluorescente con un dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada.
2. Estudiar el efecto de la inserción del dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada en la proteína de la cápside del virus del grabado del tabaco sobre el autoensamblaje en VLPs quiméricas.
3. Evaluar la respuesta fagocítica de macrófagos al interactuar con los bioconjugados.

## **8. METODOLOGÍA**

Las secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas expresadas en este trabajo se diseñaron previamente en el equipo de trabajo. Los genes sintéticos se obtuvieron por pedido con la casa comercial GenScript. El apartado de materiales indica aquellos utilizados de forma general durante todo el proceso.

### **8.1 Materiales**

La extracción de ADN plasmídico se obtuvo con el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific), los fragmentos de digestión se purificaron con el kit MinElute Gel Extraction (Qiagen). Para la cuantificación y análisis de pureza de ADN se utilizó el espectrofotómetro de microvolumen Nano Drop 2000 (ThermoScientific).

Para la transformación de células electro competentes se utilizó el instrumento Gene Pulser II (Biorad). El equipo utilizado para los cultivos celulares fue una incubadora con agitación marca IKA modelo KS 3000 IC S1. En la recuperación de pastillas celulares y procesos de ultrafiltración se emplearon una cetrífuga Hettich modelo Universal 320 R y una centrífuga modelo Megafuge 8R (Thermo Fisher Scientific).

La densidad óptica en cultivos ( $DO_{600}$ ) así como la cuantificación de proteínas se monitoreó con un espectrofotómetro de microplacas Biorad modelo xMark. En el lisado celular se empleó un sonicador Microson XL-2000 (Misonix).

La purificación de proteínas se realizó con ayuda de columnas HisTrap HP IMAC de 1 ml (GE-Healthcare Life Sciences).

Los plásmidos, construcciones génicas y productos de digestión, se analizaron por electroforesis en gel de agarosa empleando la escalera de ADN 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific) como referencia. Las electroforesis se realizaron en un sistema Mini-Sub Cell GT (Biorad). Las muestras de proteína se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y electrotransferencia utilizando sistema Mini-PROTEAN Tetra de la marca Biorad.

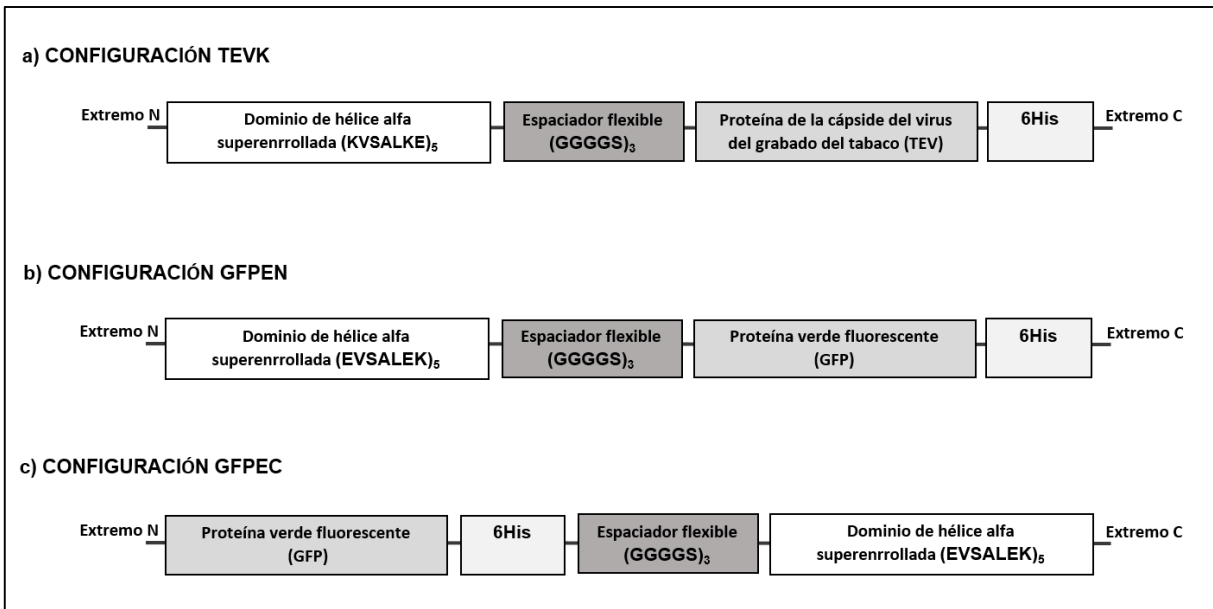
El análisis de geles de agarosa y acrilamida se realizó en un sistema de fotodocumentación Gel Doc EZ System de la marca Biorad.

En la técnica de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se usó un equipo JEM-100C (JEOL), mientras que en microscopía confocal se utilizó un equipo Leica DM5500 Q (Leica).

## **8.2 Métodos del estudio**

### **8.2.1 Análisis *in silico* de las construcciones**

La proteína quimérica TEVK fue diseñada a partir de la secuencia codificante para la CP del virus del grabado del tabaco (CP TEV) (GenBank: JX512813.1), incluyendo en su extremo N una héptada de aminoácidos “KVSALKE” con cinco repeticiones (KVSALKE)<sub>5</sub>, la cual forma un dominio de hélice alfa superenrollada y que es denominado dominio de interacción. Entre la secuencia de CP TEV y el dominio de interacción, se incluyó una secuencia espaciadora (GGGGS) con tres repeticiones (GGGGS)<sub>3</sub>. Por separado y a partir de la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) se diseñó la proteína quimérica GFPEN incluyendo en su extremo N la héptada de aminoácidos “EVSALEK” con cinco repeticiones y la secuencia espaciadora “GGGGS” con tres repeticiones entre la proteína y el dominio de interacción. De manera similar a GFPEN, se diseñó la tercera proteína quimérica GFPEC en la que se incluyó la héptada “EVSALEK” con cinco repeticiones en el extremo C y la secuencia espaciadora “GGGGS” con tres repeticiones entre la proteína y el dominio de interacción (Figura 5).



**Figura 5. Configuración gráfica de las secuencias codificantes para las proteínas quiméricas.** En **a)** se muestra la configuración de las secuencias que conforman la proteína quimérica TEVK indicando la secuencia del dominio de hélice alfa superenrollada en el extremo N. En **b)** se representa la configuración de secuencias correspondiente a la variante de la proteína verde fluorescente, denominada GFPEN, el dominio de hélice alfa superenrollada se coloca en el extremo N. En **c)** se observa la disposición del dominio de hélice alfa superenrollada en el extremo C de la proteína GFPEC, otra variante de la proteína verde fluorescente.

Se utilizó el programa CLC Sequence Viewer 7.6.1 para generar las construcciones de los plásmidos de expresión *in silico*; incluyendo los genes codificantes para las proteínas quiméricas (TEVK, GFPEN y GFPEC) en el plásmido pET28a+ se obtuvo la secuencia de aminoácidos codificada por los genes correspondientes. Las secuencias de aminoácidos finales se compararon con la secuencia de inicio de CP TEV y una secuencia reportada de GFP. En la comparación, se empleó un alineamiento por pares mediante la herramienta EMBOSS Needle del portal EMBL-EBI ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/)) utilizando los parámetros estándar sugeridos por el software.

### 8.2.2 Análisis *in silico* y predicción de la estructura terciaria de las proteínas quiméricas

Con las secuencias de aminoácidos de las proteínas recombinantes se realizó una predicción de las estructuras terciarias mediante plegamiento inverso (threading)

usando el portal Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) solicitando un modelado intensivo. Las características fisicoquímicas teóricas de las proteínas se obtuvieron con la herramienta “Protparam” del portal ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

### **8.2.3 Construcción de plásmidos recombinantes y transformación celular**

Se sintetizaron tres genes (GenScript) para la expresión óptima en *E. coli*. Estos contienen las fusiones traduccionales a los dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada, tanto de la CP TEV (denominada TEVK) como de dos versiones del antígeno completo: una con el dominio en el extremo-N (GFPEN) y otra en el extremo-C (GFPEC). Las secuencias fueron digeridas con las enzimas NcoI (New England Biolabs Inc.) y XhoI (Promega) por doble digestión y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Los productos de digestión se purificaron con el kit MinElute Gel Extraction y se cuantificaron con un Nano Drop 2000 a 260 nm. La pureza se analizó usando una relación de absorbancia 260/280 nm. Los genes sintéticos se clonaron en el plásmido de expresión bacteriana pET28a+ (Merck-Millipore) utilizando una relación 3:1 (inserto:plásmido), la ligación de fragmentos se realizó mediante incubación de los componentes ya mencionados en presencia de ADN ligasa T4 manteniendo la reacción a 16 °C durante la noche.

Con los productos de ligación (pET28/TEVK, pET28/GFPEN y pET28/GFPEC) se transformaron células *E. coli* One Shot Top 10 electro competentes (Thermo Fisher Scientific) a fin de conservar y replicar las construcciones. Para identificar las bacterias que incorporaron el plásmido recombinante se realizó una selección por resistencia a Kanamicina (50  $\mu$ g/mL concentración final). Para descartar la presencia de falsos positivos, se aislaron clones resistentes y se extrajo ADN plasmídico utilizando el kit GeneJet Plasmid MiniPrep. Se comprobó la presencia del inserto de interés por digestión con las enzimas de restricción XbaI (Promega) y XhoI (Promega).

Con las construcciones positivas obtenidas (pET28/TEVK, pET28/GFPEN y pET28/GFPEC), se transformaron células *E. coli* One Shot BL21Star (DE3) (Thermo Fisher Scientific) quimio competentes preparadas con el método de Cloruro de Calcio

incubando las células en hielo por 30 minutos, seguido de una incubación a 42 °C por 90 segundos y una incubación final en hielo por 2 minutos. Posteriormente, se agregaron 800 µl de medio SOC y se recuperaron las células incubando a 37 °C y 250 rpm por 45 minutos, de este cultivo se tomaron 100 µl para siembra en placa y se obtuvieron células transformadas crecidas a 37 °C durante la noche. La cepa expresante de la CP TEV sin  $\alpha$ -hélice superenrollada se obtuvo con anterioridad en el grupo de trabajo (Manuel Cabrera, y otros 2016).

#### **8.2.4 Expresión y purificación de las proteínas TEVK y CP TEV**

Se usó una colonia reactivada en placa con medio LB agar/Kanamicina (50 µg/mL) para inocular 4 ml de medio LB (Sigma Aldrich) que contenía Kanamicina (50 µg/ml) y se incubó durante la noche a 37 °C y 250 rpm. El preinóculo se usó para inocular 200 ml de medio Terrific Broth (Sigma Aldrich) sin antibiótico en relación 1:100, manteniéndose a 37 °C y 250 rpm, hasta alcanzar DO<sub>600</sub> de 1.0 aproximadamente después de 6 horas.

Inicialmente, se analizó la expresión de TEVK a 25 °C, 250 rpm, 0.5 mM de IPTG (Promega) y 16 h de incubación. Posteriormente, buscando las mejores condiciones de expresión se evaluaron tres concentraciones finales de IPTG (0.5 mM, 1.0mM y 2.0 mM) y los cultivos se incubaron a 20 °C y 250 rpm durante 16 h. Se utilizó un cultivo no inducido como control. Se tomaron muestras cada 4 h para monitorear la expresión de proteínas.

Por otro lado, la expresión de CP TEV sin dominio de interacción se realizó con la adición de IPTG a concentración final de 1.0 mM al cultivo con DO<sub>600</sub> de 1.0, manteniendo el cultivo a 20 °C durante 16 h.

Todas las pastillas celulares se obtuvieron por centrifugación (4 °C y 4500 rpm por 25 min) y se resuspendieron en proporción 1:10 del volumen de cultivo usando buffer de lisis (Tris-HCl 20mM pH 8.0, NaCl 500 mM). Posteriormente, se lisaron con un Sonicador Microson XL-2000. Se separó la fracción soluble de los restos celulares por centrifugación (4 °C y 5000 rpm por 25 min). Se analizaron mediante geles de SDS-PAGE al 12% y tinción con azul brillante de Coomassie, la proteína total (20 µg), fracción soluble y fracción insoluble usando el marcador de peso molecular Unstained SDS-

PAGE standards, Broad Range (Biorad). La cuantificación de extractos de proteína total se obtuvo por el método de Bradford.

La localización en fracción soluble y fracción insoluble de las proteínas TEVK así como CP TEV, todas etiquetadas con secuencia de 6 histidinas, se realizó por medio de Western Blot (WB) utilizando anticuerpos monoclonales de ratón anti-6His (Roche) en dilución 1:500 en leche 5% y se empleó un anticuerpo secundario de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa (R&D systems) en dilución 1:1000 y 4-cloro-1-naftol como desarrollador de color. Se empleó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Biorad) como referencia.

Para realizar la purificación, la fracción soluble obtenida de la proteína extraída se ajustó a 10 mM de imidazol para CP TEV y 5 mM de imidazol para TEVK. Las proteínas se purificaron por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC), usando columnas HisTrap HP de 1 ml. En el proceso de purificación se utilizaron 10 volúmenes de columna (VC) de buffer de unión (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM), posteriormente se inyectaron 20 VC de fracción soluble que contenía la proteína de interés. El proceso de lavado se llevó a cabo empleando cuatro soluciones: 30 VC con solución de lavado 1 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 200 mM, imidazol 40 mM), adicionalmente se realizaron 20 VC de solución de lavado 2 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 400 mM, imidazol 40 mM), 20 VC de solución de lavado 3 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 600 mM, imidazol 40 mM) y 20 VC de solución de lavado 4 (Tris-HCl 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 800 mM, imidazol 40 mM). Las proteínas se obtuvieron eluyendo con 10 VC del amortiguador que contenía Tris-HCl 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 500 mM y se colectaron en fracciones de 1 ml.

Las muestras obtenidas en cada paso se analizaron por SDS-PAGE y se identificaron por WB con el método en este apartado.

Para enriquecer la concentración de proteínas y favorecer la formación de VLPs, se combinaron las fracciones de elución y posteriormente se realizó un intercambio de solución amortiguadora conteniendo Tris-HCl 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM ó conteniendo PBS pH 7.4 adicionado con cloruro de sodio para concentración final de 500 mM. Para el cambio de solución amortiguadora se emplearon unidades de



filtración por centrifugación Amicon Ultra-15 (EMD Millipore) usando cortes de 10 kDa y finalmente, se concentraron en la misma unidad. Los pasos de purificación y concentración de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE con geles al 12% y tinción con azul brillante de Coomassie. La cuantificación de fracciones purificadas se obtuvo por el método de Bradford y las proteínas se almacenaron a 4 °C hasta su uso posterior.

### **8.2.5 Expresión y purificación de las proteínas GFPEN y GFPEC**

Los preinóculos de las cepas *E. coli* expresantes de GFPEN y GFPEC se obtuvieron de la misma manera que la cepa TEVK. Se agregó una alícuota de cada preinóculo en medio LB líquido (Sigma Aldrich) en relación 1:100 manteniéndose a 37 °C y 250 rpm. La expresión de GFPEN y GFPEC se indujo cuando el cultivo tenía una DO<sub>600</sub> de 1.0 adicionando IPTG a concentración final de 0.5 mM, manteniendo el cultivo a 30 °C durante 10 h. Se utilizó un cultivo no inducido como control, empleando bacterias que contenían el plásmido recombinante bajo las mismas condiciones que los cultivos inducidos sin adicionar IPTG.

Se colectaron alícuotas del cultivo en diferentes puntos de la curva de crecimiento después de realizada la inducción. Se obtuvieron las pastillas celulares por centrifugación (4 °C, 4500 rpm, 25 min). Se analizaron con el método antes descrito para TEVK, la proteína total (20 µg), fracción soluble y fracción insoluble.

Ambas versiones de GFP se identificaron por WB con anticuerpos monoclonales de ratón anti-6His (Roche) en dilución 1:500 y como anticuerpo secundario un anticuerpo de cabra anti-ratón acoplado a peroxidasa (R&D systems) en dilución 1:1000, usando 4-cloro-1-naftol como desarrollador de color.

Las proteínas GFPEN y GFPEC se purificaron con una columna HisTrap HP IMAC de 1 ml, ajustando la fracción soluble a 10 mM de y 5 mM de imidazol, respectivamente. En el proceso se utilizaron 10 VC de buffer de unión (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 10 mM), buffer de lavado (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 1 M, imidazol 40 mM), 20 VC para GFPEN y 10 VC para GFPEC. Finalmente, se usaron 10 VC de buffer de elución (Tris-HCl 20 mM, pH 8.0, NaCl 500 mM, imidazol 500 mM).

La fluorescencia de ambas versiones se confirmó exponiendo las fracciones de elución a luz UV en un dispositivo Steren SEG-050. Además, las eluciones se analizaron por SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie. Se mezclaron las fracciones que mostraron mayor concentración de proteína y se les realizó un intercambio de solución amortiguadora a Tris-HCl 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM ó con PBS pH 7.4, NaCl 500 mM empleando unidades de filtración por centrifugación Amicon Ultra-15 (EMD Millipore) con membrana de corte de 10 kDa y finalmente se realizó la concentración de proteínas (10X). Las proteínas obtenidas se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

### **8.2.6 Determinación de la formación de VLPs mediante microscopía electrónica de transmisión**

Para confirmar la capacidad de autoensamblaje de la proteína quimérica CP TEVK en VLPs, se prepararon composiciones de proteína a concentraciones de 200 µg/ml y se compararon con VLPs obtenidas de composiciones a la misma concentración de la CP TEV sin dominio de alfa hélice superenrollada. Además, se prepararon composiciones mezclando la proteína quimérica CP TEVK con las proteínas GFPEN y GFPEC respectivamente en relación ~1:1 molar y concentraciones finales de 200 µg/ml de cada proteína, el mismo paso se repitió con la CP TEV. Todas las preparaciones se prepararon en solución amortiguadora (Tris 20 mM pH 8.0, NaCl 500 mM, EDTA 20 mM). Las preparaciones se colocaron en rejillas de cobre recubiertas de formvar y se tiñeron negativamente con una solución de acetato de uranilo al 2%. Las rejillas se analizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión.

### **8.2.7 Análisis comparativo *in vitro* de la fagocitosis de los bioconjugados o de antígenos solubles por macrófagos**

Para evaluar la internalización de proteínas y VLPs quiméricas se realizó un ensayo de fagocitosis, en el que se utilizó una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7). La línea celular se mantuvo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo MEM (Hyclone/GE) suplementado con 10% de SFB (GIBCO/BRL). El ensayo se realizó en

placas de cultivo de 12 pozos, se colocó un cubreobjetos en el fondo de cada pozo y se sembraron  $3 \times 10^5$  células en 800  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo por pozo. Se emplearon los siguientes tratamientos: 1) 200  $\mu\text{l}$  de PBS como control negativo 2)  $1 \times 10^6$  perlas de látex de 1  $\mu\text{m}$  de diámetro acopladas a FITC (Molecular Probes) como control positivo, 3) 10  $\mu\text{g}$  de CP TEV, 4) 10  $\mu\text{g}$  de la proteína CP TEVK, 5) 10  $\mu\text{g}$  de la proteína GFPEC, 6) 10  $\mu\text{g}$  de la proteína GFPEN, 7) 10  $\mu\text{g}$  de cada proteína en una mezcla CP TEV/GFPEC, 8) 10  $\mu\text{g}$  de cada proteína en una mezcla CP TEV/ GFPEN, 9) 10  $\mu\text{g}$  de cada proteína en una mezcla bimodular CP TEVK/ GFPEC y 10) 10  $\mu\text{g}$  de cada proteína en una mezcla bimodular CPK/ GFPEN; todas las formulaciones de proteínas se prepararon en PBS (500 mM NaCl, pH 7.4) y se adicionaron a cada pozo. Las células con los diferentes tratamientos se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por 45 y 90 minutos, posteriormente, las muestras se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con metanol enfriado previamente a -20°C y se lavaron dos veces con PBS. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector) y las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Leica DM5500 Q con un objetivo de inmersión de aceite 20x.

## 9. RESULTADOS

### 9.1 Secuencias y configuraciones de las proteínas quiméricas

Las secuencias de aminoácidos obtenidas por traducción *in silico* a partir de las construcciones con el vector pET28a+ se muestran en la Tabla 2. La organización de las secuencias correspondientes a los dominios de interacción, espaciador flexible y las proteínas utilizadas se muestra de manera gráfica en la figura 1. La identidad y similitud entre la fracción correspondiente en nuestras secuencias y las secuencias reportadas para las proteínas CP TEV y GFP se verificó mediante alineación de secuencias en pares utilizando el algoritmo de alineación de Needleman-Wunsch para encontrar la alineación óptima (incluyendo gaps).

**Tabla 2. Secuencias de aminoácidos de las proteínas quiméricas y secuencias de referencia.**

Proteína	Secuencia de aminoácidos
<b>TEVK</b>	MGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGGGGSGGGSSGGSSGTVDAGADAS KKKDHKDDKVAEQVSRDRDYNAGTSGTFSVPRINAMATKLQYPRMRKEVVVNLHLLGYKPQQI YLSNARATHEQFAAWHQAVMAAYGVNEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGTWVMMDGEEQV SYPLKPMVENAQPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNREQPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFDFYELT SKTPVRAREAHMQMKA AAVRNSGTRFLGLDGNVGTAEEDTERHTAHDVNRNMHTLLGVRQLEH HHHHH
<b>CP TEV (GenBank: JX512813.1)</b>	SGTVDAGADASKKKDHKDDKVAEQVSRDRDYNAGTSGTFSVPRINAMATKLQYPRMRKEVVVNL DHLLGYKPQQIYLSNARATHEQFAAWHQAVMAAYGVNEEQMKILLNGFMVWCIENGTSPNLNGT WVMMDGEEQVSYPLKPMVENAQPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNREQPYMPRYGLQRNITDMSL SRYAFDFYELTSKTPVRAREAHMQMKA AAVRNSGTRFLGLDGNVGTAEEDTERHTAHDVNRNM HTLLGVRQ
<b>GFPEN</b>	MGEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKGGGGSGGGSSGGGSGTKGEELFTGVVP ILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHM KRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKEDGNILGHKLEYN YNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS PNEKRDHMLLEFVTAAGITHGVDELYQPGGHHHHHH
<b>GFPEC</b>	MGTGGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFS YGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDF KEDGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLP DNHYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGVDELYQPGGHHHHHHGGGGSGGGSSGG GGSEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK
<b>GFP (UniProtKB/Swiss- Prot: P42212.1)</b>	SKGEELFTGVVPILVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICTTGKLPVPWPTLVTTFSY GVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIDFKE DGNILGHKLEYNNSHNVYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDN HYLSTQSALSKDPNEKRDHMLLEFVTAAGITHGMDELYK

Los resultados indicaron que las secuencias de los genes sintéticos no alteran el marco de lectura para la traducción de las proteínas de interés. Se observó el 100% de identidad entre la secuencia de referencia y la secuencia obtenida después de insertar el gen sintético de TEVK en el vector de expresión (Figura 6). En el caso de las secuencias correspondientes a las versiones GFPEC y GFPEN, los resultados indican

cuatro residuos distintos a lo largo de la secuencia de aminoácidos en comparación con la secuencia de GFP utilizada para este alineamiento. Cabe mencionar que se mantienen los residuos implicados en la actividad del cromóforo reportados como Ser65 y Arg96 (Ormö, y otros 1996) y que corresponden a los sitios marcados en las figuras 7 y 8, respectivamente. Este dato permitió inferir que las versiones de GFP generarían estructuras similares a las nativas y que por lo tanto mantendrían su fluorescencia.

```

#=====
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 323
# Identity:      263/323 (81.4%)
# Similarity:   263/323 (81.4%)
# Gaps:         60/323 (18.6%)
# Score: 1376.0
#=====
EMBOSS_001      1 ----- 0
EMBOSS_001      1 MGKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEKVSALKEGGGGSGGG 50
EMBOSS_001      1 --SGTVDAGADASKKKDHKDDKVAEQVSRDRDVNAGTSGTFSVPRINAMA 48
EMBOSS_001      51 GSSGTVDAGADASKKKDHKDDKVAEQVSRDRDVNAGTSGTFSVPRINAMA 100
EMBOSS_001      49 TKLQYPRMRKEVVVNLDHLLGYKQQIYLSNARATHEQFAAHQAVMAAY 98
EMBOSS_001     101 TKLQYPRMRKEVVVNLDHLLGYKQQIYLSNARATHEQFAAHQAVMAAY 150
EMBOSS_001      99 GVNEEQMKILLNGFMVNCIENGTSPNLNGTWMMDGEEQVSYPLKPMVEN 148
EMBOSS_001     151 GVNEEQMKILLNGFMVNCIENGTSPNLNGTWMMDGEEQVSYPLKPMVEN 200
EMBOSS_001     149 AQPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNREQPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFD 198
EMBOSS_001     201 AQPTLRQIMTHFSDLAEAYIEMRNREQPYMPRYGLQRNITDMSLSRYAFD 250
EMBOSS_001     199 FYELTSKTPVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTA 248
EMBOSS_001     251 FYELTSKTPVRAREAHMQKAAAVRNSGTRLFGLDGNVGTAEEDTERHTA 300
EMBOSS_001     249 HDVNRNMHTLLGVRQ----- 263
EMBOSS_001     301 HDVNRNMHTLLGVRQLEHHHHH 323

```

**Figura 6. Alineamiento de secuencias TEVK vs CP TEV.** Se verifica la conservación de la secuencia de aminoácidos correspondiente a la CP TEV (residuos 52 a 316) después de movilizar el gen recombinante TEVK al vector de expresión. Resultados obtenidos con el algoritmo de Needleman-Wunsch mediante la herramienta EMBOSS Needle.



```

#####
#
# Aligned_sequences: 2
# 1: EMBOSS_001
# 2: EMBOSS_001
# Matrix: EBLOSUM62
# Gap_penalty: 10.0
# Extend_penalty: 0.5
#
# Length: 298
# Identity:   233/298 (78.2%)
# Similarity: 237/298 (79.5%)
# Gaps:      61/298 (20.5%)
# Score: 1255.0
#####

EMBOSS_001      1  --SKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICT      48
      :|||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
EMBOSS_001      1  MGTKGEELFTGVVPIVLVDGVDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLT LKFICT      50

EMBOSS_001     49  TGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIF      98
      |||:|||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
EMBOSS_001     51  TGKLPVPWPTLVTTFSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIF     100
      |||:|||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||

EMBOSS_001     99  FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN     148
      |||:|||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
EMBOSS_001    101  FKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRIELKGIIDFKEDGNILGHKLEYNYNSHN     150

EMBOSS_001    149  VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH     198
      |||:|||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
EMBOSS_001    151  VYIMADKQKNGIKVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNH     200

EMBOSS_001    199  YLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITHGMDELYK-----      237
      |||:|||||||||||||||||||||||||||||||||:|||||
EMBOSS_001    201  YLSTQSALS KDPNEKRDMVLLFVTAAGITHGVDELYQPGGHHHHHHGG      250

EMBOSS_001    238  -----      237

EMBOSS_001    251  GSGGGGGSGGGSEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEKEVSALEK      298

```

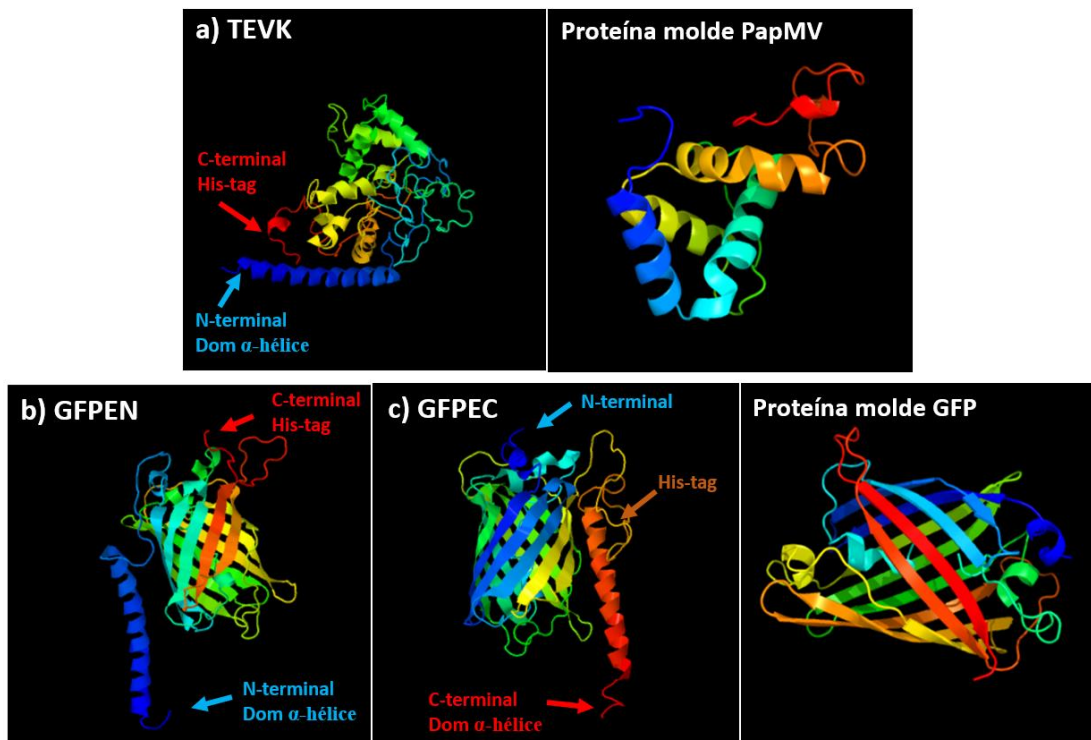
**Figura 8. Alineamiento de secuencias GFPEC vs GFP.** La presencia de los residuos Ser65 y Arg96 correspondientes al cromóforo de la proteína GFP se identificaron en la secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína quimérica GFPEN, al compararla con una proteína de referencia. Resultados obtenidos con el algoritmo de Needleman-Wunsch mediante la herramienta EMBOSS Needle.

**9.2 Estructura terciaria de las proteínas quiméricas y propiedades fisicoquímicas teóricas**

El modelo de TEVK (Figura 9a) mostró el 21% de identidad con una estructura de la cápside del virus del mosaico de la papaya (CP PapMV) usada como molde reportada en Protein Data Bank (PDB) (Tabla 3). Entre las estructuras cristalizadas reportadas en PDB no se encuentran CP de potyvirus, por lo que el modelo no se relaciona con

alguna proteína de este origen, sin embargo, algo interesante es que el modelado relaciona la proteína modificada con la CP de virus flexibles filamentosos, siendo la flexibilidad una característica de las partículas virales y CP potyvirales.

Para favorecer la interacción de dominios entre ambas proteínas es importante que los dominios se encuentren accesibles, de forma que los modelos teóricos ofrecen una predicción de la probable disposición del dominio de interacción y la etiqueta de histidinas. En la Figura 9, se observa que la estructura sugiere la exposición del dominio de  $\alpha$ -hélice en todas las proteínas recombinantes.



**Figura 9. Estructura teórica de las proteínas quiméricas.** Modelos teóricos que muestran la posible disposición de los dominios de interacción (hélice alfa superenrollada) y etiqueta de histidinas en las proteínas TEVK, GFPEN y GFPEC, así como la similitud gráfica con proteínas molde. **a)** Modelado de la proteína TEVK. **b)** Modelado de la proteína GFPEN. **c)** Modelado de la proteína GFPEC. Todos los modelados se obtuvieron con Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>).

Además, se generaron estructuras con porcentajes de identidad de hasta 98% entre nuestras versiones de GFP y estructuras reportadas en PDB (Figura 9b y 9c). La



similitud permitió inferir que GFPEN y GFPEC conservarían la estructura y la propiedad fluorescente de GFP nativa, la cual es una característica deseable para la identificación de la proteína.

**Tabla 3. Resultados del modelado *in silico*, similitud y proteínas utilizadas como molde.**

<b>Modelado <i>in silico</i></b>			
<b>Proteína</b>	<b>Identidad</b>	<b>Proteína molde</b>	<b>Código PDB</b>
TEVK	21 %	Proteína de la cápside del virus del mosaico de la papaya (PapMV)	4DOX
GFPEN	98%	Proteína verde fluorescente (GFP)	5FGU
GFPEC	98%	Proteína verde fluorescente (GFP)	5FGU

Fuente: Datos obtenidos con Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis.

El peso molecular teórico es de ~35.8 kDa para los monómeros de TEVK, ~32.7 kDa para GFPEC y ~32.7 kDa para GFPEN, calculados con ProtParam (ExPASy Bioinformatics Resource Portal).

Como características fisicoquímicas destacables para TEVK se obtuvieron:

- pl teórico: 8.74
- Tiempo de vida media estimada: mayor a 10 horas en *E. coli (in vivo)*, mayor a 20 horas en levaduras (*in vivo*).
- Índice de inestabilidad: 32.20, clasificando como proteína estable.
- Índice de hidrofobicidad: -0.617

Para la proteína GFPEN se obtuvieron las siguientes:

- pl teórico: 5.64
- Tiempo de vida media estimada: mayor a 10 horas en *E. coli (in vivo)*, mayor a 20 horas en levaduras (*in vivo*).
- Índice de inestabilidad: 30.04, clasificando como proteína estable.
- Índice de hidrofobicidad: -0.54

Finalmente, para la proteína GFPEC se obtuvieron:

- pl teórico: 5.64

- Tiempo de vida media estimada: mayor a 10 horas en *E. coli* (*in vivo*), mayor a 20 horas en levaduras (*in vivo*).
- Índice de inestabilidad: 30.59, clasificando como proteína estable.
- Índice de hidrofobicidad: -0.54

Es de gran relevancia que el índice de hidrofobicidad (GRAVY) de esta herramienta clasificó a las proteínas TEVK, GFPEN y GFPEC como no hidrofóbicas de acuerdo a la escala de Kyte y Doolittle, lo que sugiere la solubilidad de estas proteínas en medio acuoso en las condiciones adecuadas. Otro dato importante es la vida media aproximada, que constituye un parámetro de aproximación para establecer los criterios de tiempo en la recuperación de la proteína después de la inducción de su expresión en el cultivo bacteriano, procurando limitar su exposición a la degradación por el entorno.

### 9.3 Integración de fragmentos en los plásmidos recombinantes

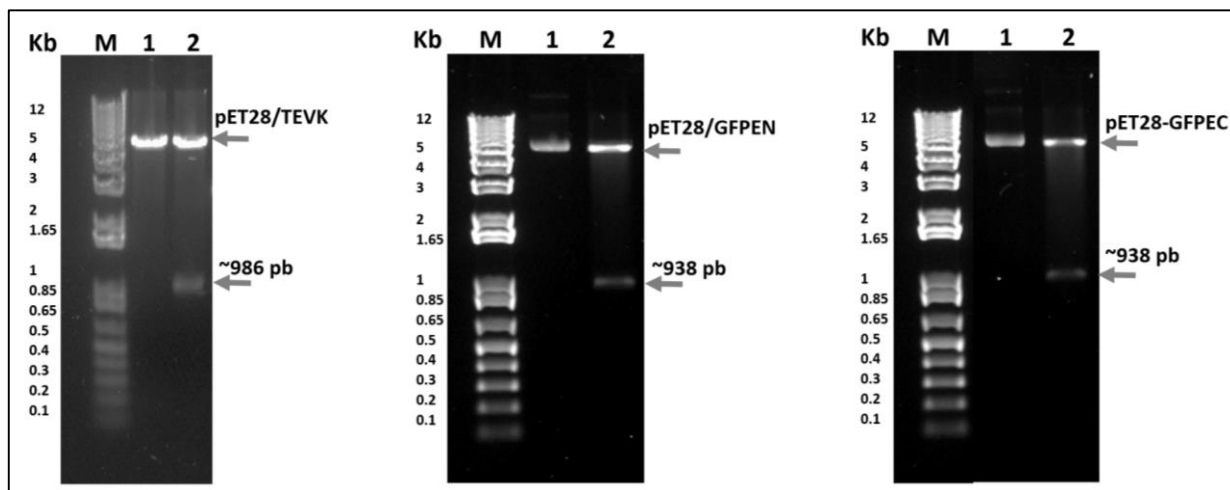
El servicio de GenScript proporcionó plásmidos pUC57, los cuales contenían los genes sintéticos TEVK, GFPEC, GFPEN. Se identificaron los tamaños de los fragmentos correspondientes a cada gen para la clonación de éstos en el vector de expresión bacteriana pET28a+. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Tamaño de las construcciones y fragmentos esperados por digestión con enzimas de restricción.**

Plásmido	Tamaño de plásmido	Tamaño del constructo			Sitios de restricción	Fragmentos de interés		
		GFPEN	GFPEC	TEVK		GFPEN	GFPEC	TEVK
pUC57	2,710 pb	3,616 pb	3,635 pb	3,664 pb	NcoI-XhoI	899 pb	899 pb	947 pb
pET28a+	5,369 pb	6,130 pb	6,130 pb	6,178 pb	NcoI-XhoI	899 pb	899 pb	947 pb
					XbaI-XhoI	938 pb	938 pb	986 pb

Tamaños correspondientes a los fragmentos de interés en las construcciones obtenidas con el vector de replicación (pUC57) y el vector de expresión (pET28a+) respectivamente. Estos datos permiten comprobar la presencia del inserto al realizar una digestión enzimática con los pares de enzimas indicados.

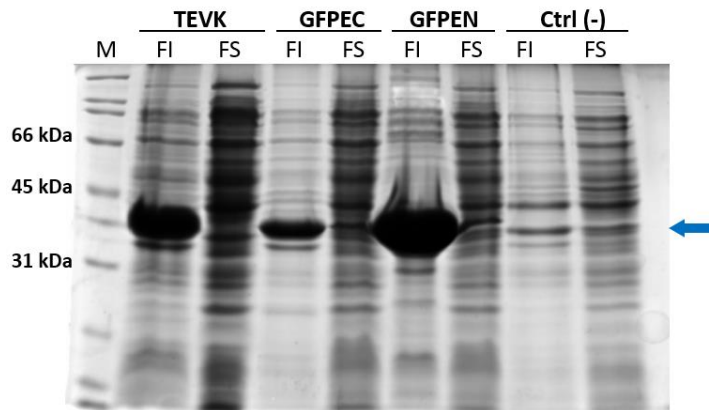
Se confirmó la integración de los fragmentos de interés en los plásmidos de expresión así como la correcta transformación celular con las construcciones al identificarse fragmentos por encima de 900 pb correspondientes a los tamaños esperados para los genes recombinantes (Figura 10).



**Figura 10. Confirmación de la transformación celular y construcciones con el vector de expresión.** Fotografías de los patrones electroforéticos en geles de agarosa. Se muestran las construcciones pET28/TEVK, pET28/GFPEN Y pET28/GFPEC no digeridas y con un peso >6000 pb (carril 1). El resultado de la digestión de cada construcción con las enzimas de restricción XbaI y XhoI (carril 2) evidenció fragmentos con tamaños correspondientes a los genes de las proteínas quiméricas (~986pb y ~938 pb). M: Escalera de ADN 1 Kb Plus (Thermo Fisher Scientific).

#### 9.4 Análisis de expresión de las proteínas quiméricas en *E. coli*

La expresión de las proteínas quiméricas TEVK, GFPEC y GPEN se evidenció bajo condiciones de inducción de partida (IPTG 0.5mM/25 °C/16h). Se identificaron bandas abundantes correspondientes a los pesos teóricos aproximados de las proteínas (>31 kDa). No obstante, se observó mayor concentración de todas las proteínas en la fracción insoluble de los lisados bacterianos (Figura 11).

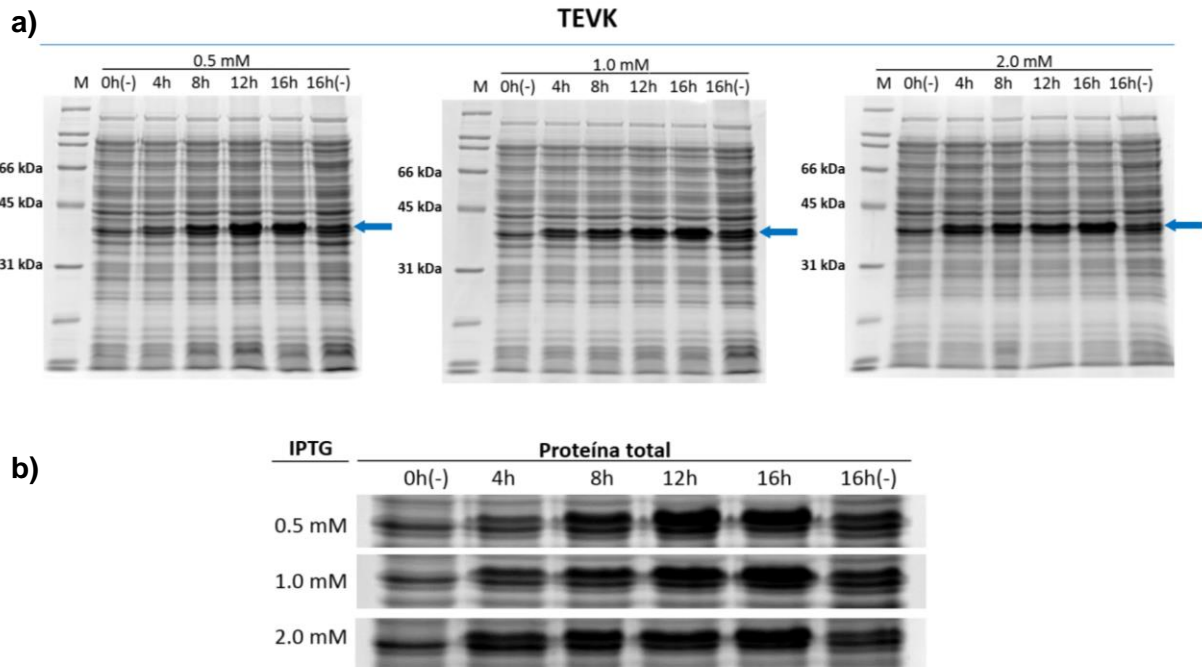


**Figura 11. Análisis de expresión de las proteínas quiméricas.** Mediante SDS-PAGE, se identificó la sobreexpresión de proteínas correspondientes al peso esperado para las proteínas quiméricas. Cultivos inducidos (TEVK, GFPEC y GFPEN) y cultivo no inducido (-): Fracciones insolubles (FI) y solubles (FS). M: Marcador de peso molecular.

La extracción de proteínas de la fracción insoluble usualmente involucra el uso de detergentes y/o agentes caotrópicos los cuales provocan desnaturalización de proteínas, por lo que existe el riesgo de impedir el re-plegamiento correcto de las proteínas y con ello interferir en formación de VLPs. Bajo esta premisa, se realizaron experimentos adicionales con la finalidad de conocer las condiciones adecuadas para obtener un mejor rendimiento de proteínas en estado nativo a partir de la fracción soluble.

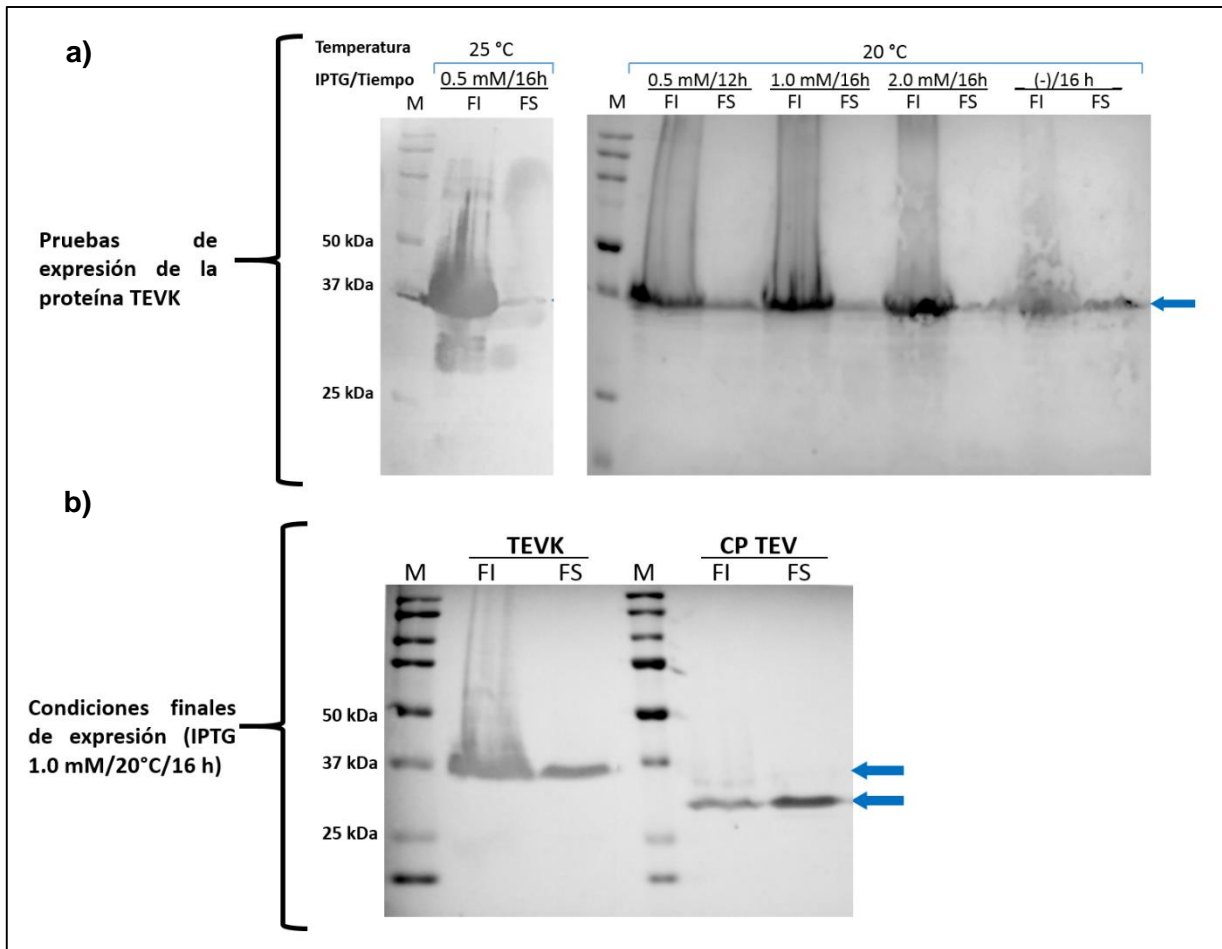
#### 9.4.1 Expresión de las proteínas TEVK y CP TEV

Habiendo comprobado la expresión de la proteína quimérica TEVK y buscando mejorar la concentración de esta proteína en la fracción soluble, se observó la evolución de la expresión por exposición del cultivo a 20 °C y distintas concentraciones de IPTG. En orden de abundancia, se encontraron bandas de proteínas que coinciden con el peso molecular teórico (~34.8 kDa) de TEVK (Figura 12a).



**Figura 12. Expresión de la proteína TEVK en *E. coli*.** Cinéticas de expresión evaluadas por SDS-PAGE. **a)** Evaluación de proteína total de cultivos inducidos con IPTG a distintas concentraciones. **b)** Comparación de las bandas correspondientes a la expresión de la proteína TEVK, extraídas de los tratamientos mostrados en **a**. M: Marcador de peso molecular. Cultivos no inducidos como control de expresión (-).

De acuerdo con el análisis de expresión, los puntos máximos de expresión se encontraron en 12 h y 16 h para las diferentes concentraciones de IPTG utilizadas (0.5, 1.0 y 2.0 mM) (Figura 12b). Cabe mencionar que, de forma cualitativa, no se observó diferencia considerable en los niveles de expresión al variar la concentración de inductor. En cambio, en estos puntos se identificó mayor acumulación de la proteína TEVK en la fracción soluble, en comparación con la obtenida en el ensayo inicial de expresión a 25°C y 16 h de expresión (Figura 13a).



**Figura 13. Inmunodetección y comparación de la distribución de las proteínas TEVK y CP TEV en fracción insoluble y soluble. a)** Distribución de la proteína TEVK en condiciones de expresión de partida (IPTG 0.5 mM/16 h/25 °C) y en los puntos de mayor expresión obtenidos a 20 °C. **b)** Identificación proteínas de interés en FS con los parámetros finales de expresión. FI: Fracción insoluble. FS: Fracción soluble. M: Marcador de peso molecular.

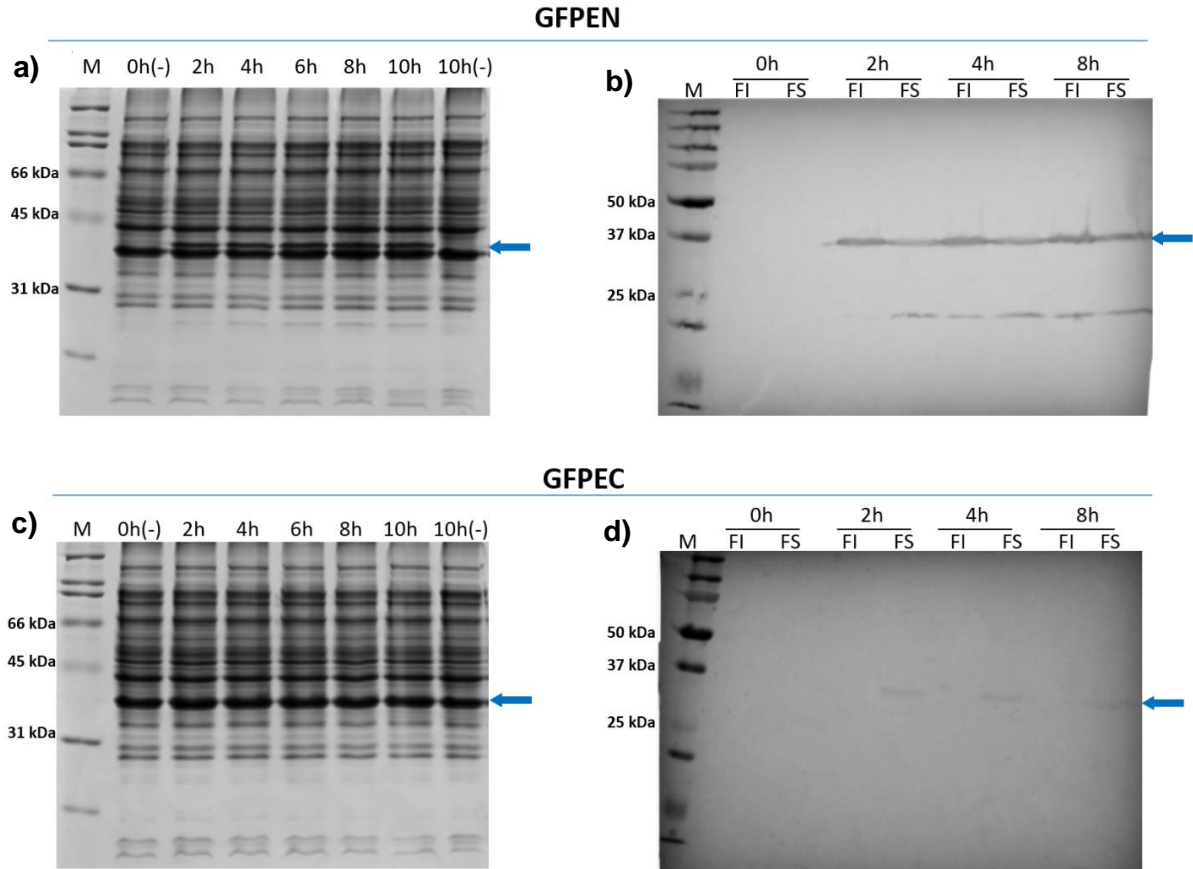
Después de evaluar dos temperaturas y tres concentraciones de inductor se logró mejorar el rendimiento de proteínas en fracción soluble, resultando mejor a 20 °C. Es conocido que existe expresión basal de la proteína de interés en ausencia de IPTG, esto se debe a cierta expresión de la ARN polimerasa T7 en lisogenos  $\lambda$ DE3. En este caso, se observó expresión basal en cultivos no inducidos; el nivel de expresión es similar al observado después de 4-8 h de inducción con IPTG y se debe probablemente a fugas en la expresión de la polimerasa T7 como reflejo de la ineficacia en el control negativo del promotor *lac* (Rossano y Ceccarelli 2014).

La proteína CP TEV, con un peso molecular de ~30.1 kDa, se obtuvo bajo las condiciones previamente establecidas en el grupo de trabajo (Manuel Cabrera, y otros 2016). Debido a que las condiciones favorables para obtener la proteína TEVK en fracción soluble se asemejan a las de CP TEV, para ambos cultivos se estableció la inducción con IPTG 1.0 mM/20°C/16h (Figura 13b). La proteína CP TEV se obtuvo como referencia en la formación de VLPs y como control en el acarreamiento de antígenos por VLPs quiméricas.

#### **9.4.2 Expresión de las proteínas GFPEN y GFPEC**

El análisis inicial de las fracciones insoluble y soluble mostró proteínas GFPEN en la fracción soluble, mientras que GFPEC se encontró en fracción insoluble (Figura 11).

Para favorecer la proteína en fracción soluble se indujo su expresión con 0.5mM IPTG a 30 °C durante 5 h. La expresión de la proteína GFPEN se evidenció encontrando una banda cercana al peso molecular teórico correspondiente a esta proteína de un tamaño de ~32.7 (Figura 14a). La identidad así como el direccionamiento de GFPEN se pudo confirmar por WB (Figura 14b). Por otro lado, la expresión de GFPEC no pudo determinarse adecuadamente por SDS-PAGE ya que la presencia de esta proteína se enmascara con el proteoma de *E. coli* (Figura 14c), pero se logró identificar por WB (Figura 14d). En ambos casos se evidenció expresión constante a partir de 2 h de inducción así como la mejora en el direccionamiento de ambas versiones hacia la fracción soluble cuando la expresión se indujo a 30 °C. Cabe mencionar que se observaron menores niveles de expresión de la versión GFPEC en comparación con la versión GFPEN.

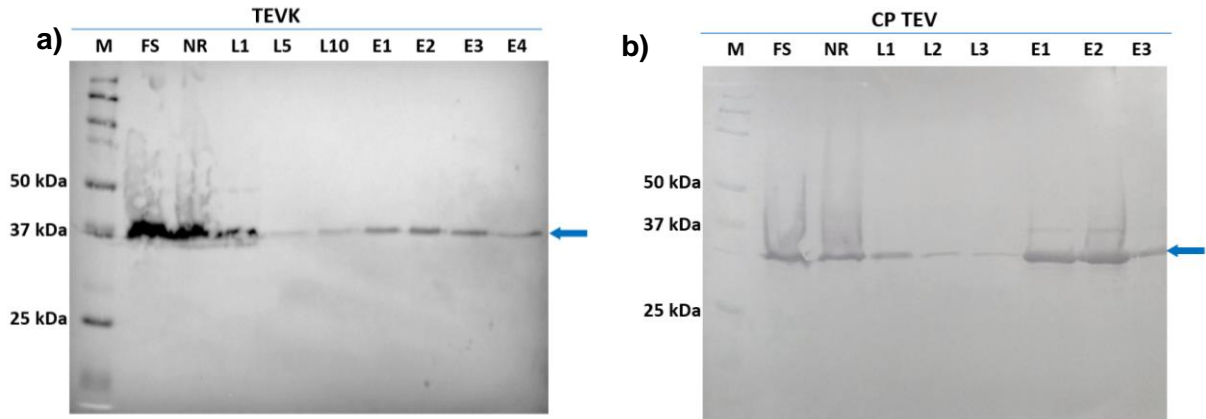


**Figura 14. Expresión y direccionamiento de GFPEN y GFPEC.** a) Muestra la evolución en la expresión de la proteína GFPEN, analizada por SDS-PAGE. b) Muestra la evolución en la expresión de la proteína GFPEN y su distribución, identificación por Western Blot. c) Muestra la evolución en la expresión de la proteína GFPEC, analizada por SDS-PAGE. d) Muestra la evolución en la expresión de la proteína GFPEC y su distribución, identificación por Western Blot. FI: Fracción insoluble. FS: Fracción soluble. M: Marcador de peso molecular.

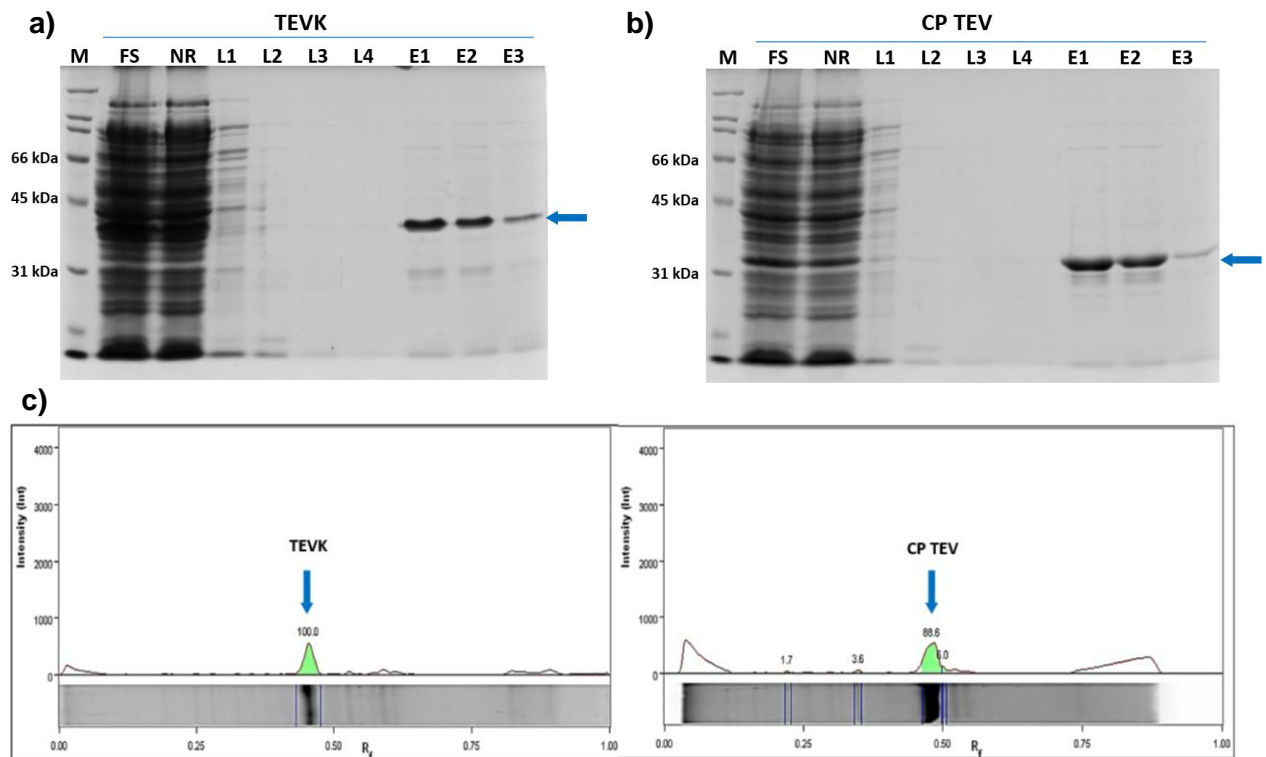
### 9.5 Purificación de las proteínas e inmunodetección por WB

En la obtención de proteínas purificadas se probaron distintas condiciones. Inicialmente, se confirmó la identidad de las proteínas TEVK y CP TEV en cada paso del proceso (Figura 15a y 15b). Se observó que la concentración de imidazol como competidor en los sitios de unión  $\text{Ni}^{2+}$  desplaza sustancialmente a las proteínas TEVK. Las proteínas TEVK y CP TEV se obtuvieron siguiendo el mismo proceso de purificación, el resultado final de este se muestra en la Figura 16.





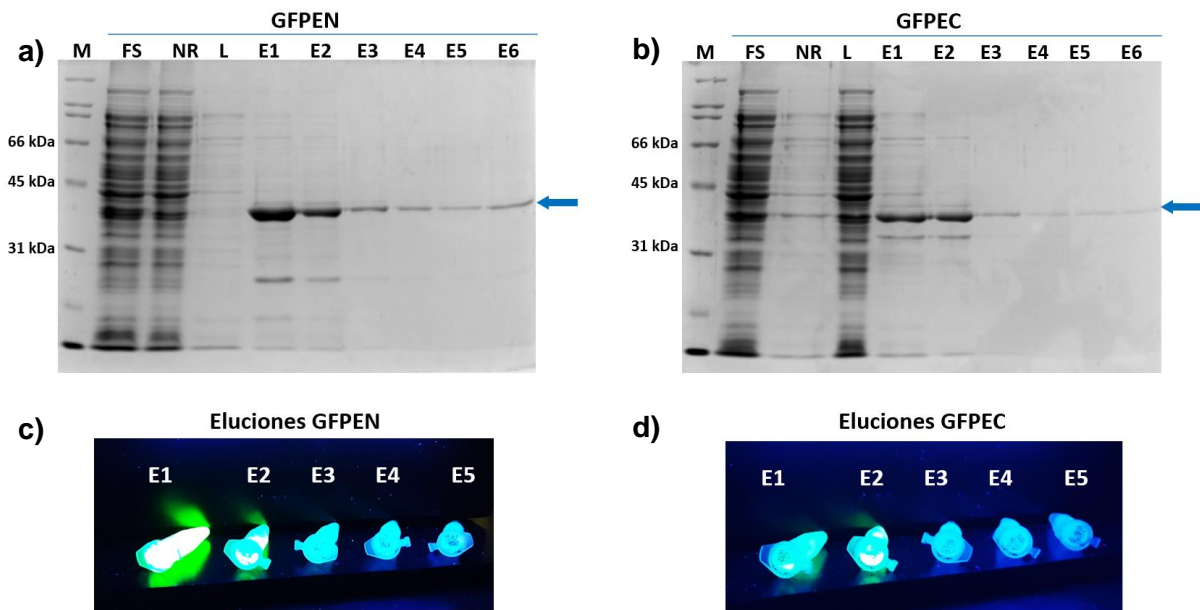
**Figura 15. Identificación de TEVK y CP TEV en el proceso de purificación por IMAC.** Proceso de purificación monitoreado por Western Blot. **a)** Identificación de TEVK. **b)** Identificación de CP TEV. FS: Fracción soluble sin purificar. NR: Fracción no retenida en columna. L: Fracciones de lavado. E: Fracciones de elución (1ml cada una). M: Marcador de peso molecular.



**Figura 16. Análisis de la purificación de TEVK y CP TEV.** Seguimiento del proceso y estimación de pureza de las proteínas purificadas por IMAC. **a)** Purificación de TEVK. **b)** Purificación de CP TEV. **c)** Pureza obtenida en cada mezcla de eluciones después de enriquecerlas. FS: Fracción soluble sin purificar. NR: Fracción no retenida. L: Fracciones de lavado. E: Fracciones de elución. M: Marcador de peso molecular.

La purificación con gradiente de NaCl permitió obtener fracciones de elución y fracciones concentradas que evidenciaron alto grado de pureza (Figura 16c). Después del enriquecimiento de proteínas se obtuvo un rendimiento de ~1.0 mg/l de cultivo para proteínas TEVK y de ~1.5 mg/l de cultivo para CP TEV.

Para analizar el acoplamiento de GFPEC y GFPEN a las posibles VLPs se continuó con la expresión y purificación de estas versiones de proteína fluorescente, obteniéndose proteínas purificadas por IMAC a partir de la fracción soluble (Figura 17a y 17b). Su identidad se confirmó por fluorescencia (Figura 17c y 17d). Tal como se dedujo a través del análisis *in silico*, las eluciones de ambas versiones conservan la propiedad fluorescente.



**Figura 17. Análisis de la purificación de GFPEN y GFPEC e identificación por fluorescencia.** a) Purificación de las proteínas GFPEN. b) Purificación de las proteínas GFPEC. c) Confirmación de por fluorescencia en GFPEN. d) Confirmación de fluorescencia en GFPEC. FS: Fracción soluble sin purificar. NR: Fracción no retenida. L: Fracciones de lavado. E: Fracciones de elución. M: Marcador de peso molecular.

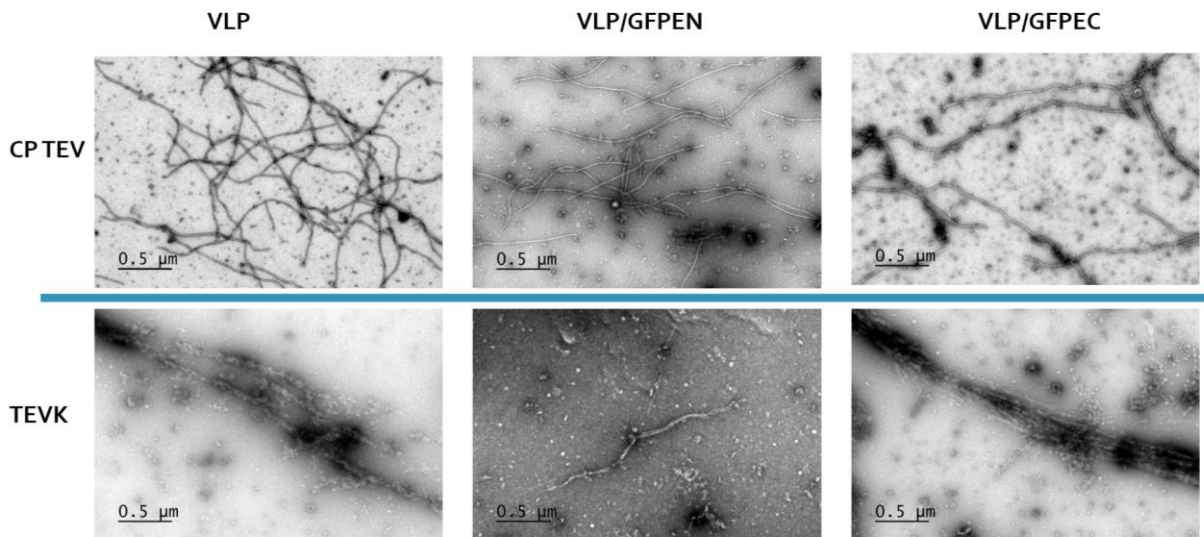
El resultado indica que la inserción del dominio de interacción así como las condiciones de extracción no comprometen la actividad y tampoco la estabilidad de GFP. La conservación de fluorescencia en ambas versiones de GFP que contienen los

dominios de alfa hélice superenrollada permitió identificar y localizar la proteína en macrófagos murinos al realizar un ensayo de fagocitosis.

### 9.6 Determinación VLPs quiméricas en presencia de antígenos completos con dominio de hélice alfa superenrollada complementario

Para asegurar formación de VLPs con las proteínas quiméricas TEVK obtenidas, así como su estabilidad frente a la interacción con otras proteínas quiméricas que presentan un dominio de  $\alpha$ -hélice complementario (GFPEP y GFPEC), las proteínas obtenidas y sus respectivas mezclas se observaron por TEM.

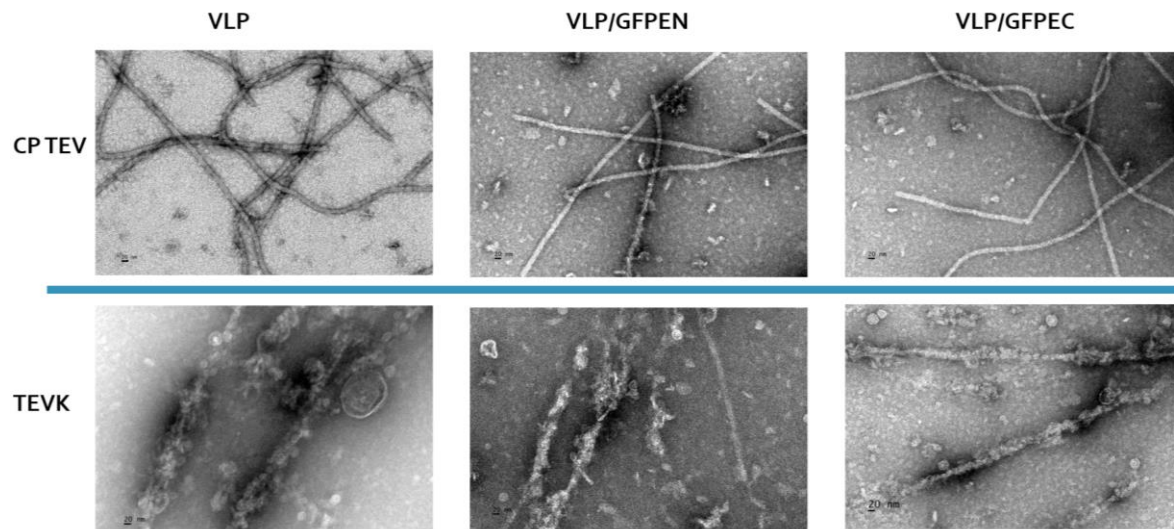
La utilidad del método para obtener VLPs quiméricas se demostró al encontrar partículas filamentosas en preparaciones de proteínas TEVK y compararlas con las preparaciones de CP TEV sin dominio de  $\alpha$ -hélice consideradas partículas de referencia. En ambos casos, se observaron partículas filamentosas de longitud  $>1 \mu\text{m}$  (Figura 18).



**Figura 18. Observación de VLPs filamentosas obtenidas con las proteínas TEVK y CP TEV.** Observación de filamentos mediante TEM. Filas: VLPs formadas por CP TEV y por TEVK respectivamente. Columnas: Proteínas de la cápside (VLPs), proteínas de la cápside mezcladas con GFPEN (VLPs/GFPEN), proteínas de la cápside mezcladas con GFPEC (VLPs/GFPEC).

También se confirmó que la presencia de las proteínas quiméricas GFPEN y GFPEC como componente de una mezcla TEVK/GFPEN y TEVK/GFPEC continúa dando como resultado VLPs quiméricas de tamaño similar al obtenido antes de la mezcla.

Por otro lado, se observó que la proteína TEVK retiene la capacidad de autoensamblarse en VLPs incluso en presencia de las proteínas quiméricas GFPEN y GPEC que contienen dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada complementarios, mostrando una superficie con protuberancias que difiere de la morfología observada en VLPs de CP TEV (Figura 19). Las estructuras obtenidas con las diferentes mezclas sugieren además que la disposición del dominio en las proteínas que se acoplan a las VLPs quiméricas puede orientarse en el extremo N o C en dependencia de la estabilidad o conformación de la proteína a acarrear sin comprometer la formación de las VLPs.



**Figura 19. Morfología de VLPs filamentosas obtenidas con las proteínas TEVK y CP TEV.** Acercamientos obtenidos mediante TEM. Filas: VLPs formadas por CP TEV y por TEVK respectivamente. Columnas: Proteínas de la cápside (VLPs), proteínas de la cápside mezcladas con GFPEN (VLPs/GFPEN), proteínas de la cápside mezcladas con GFPEC (VLPs/GFPEC).

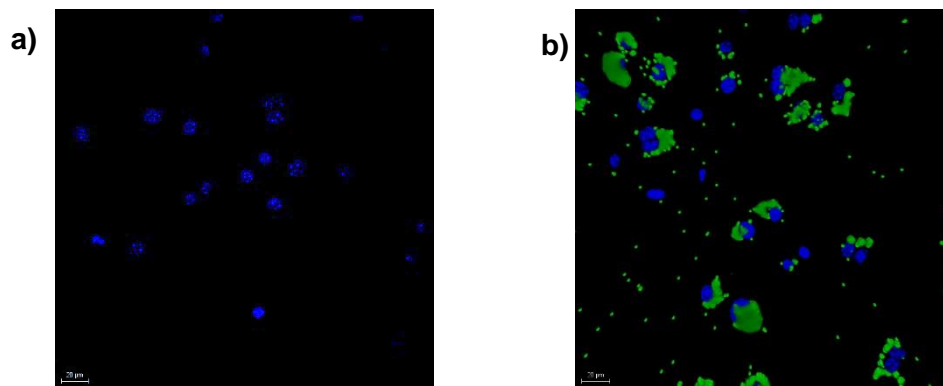
## **9.7 Actividad fagocítica de macrófagos en presencia de bioconjugados y antígenos solubles**

Una actividad fundamental en modelos vacunales es la fagocitosis de antígenos por células del sistema inmune innato, a partir de este evento se inicia la respuesta adaptiva para la protección contra los patógenos y/o antígenos acoplados al sistema.

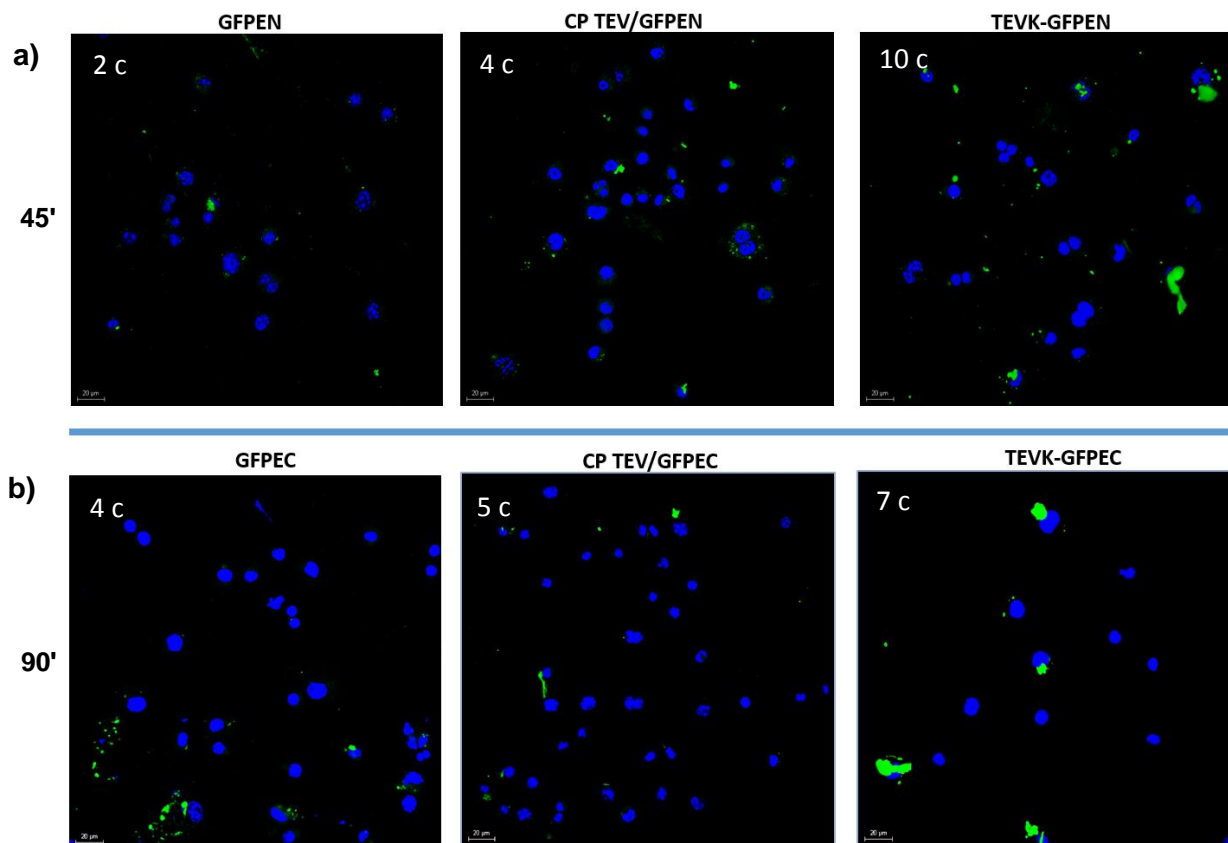
La presentación repetitiva de antígenos como en el caso de VLPs tiende a favorecer el reconocimiento de éstos por células del sistema inmune, entre ellas las células presentadoras de antígenos como macrófagos o células dendríticas, las cuáles internalizan los antígenos para posteriormente llevar a cabo su procesamiento. Se evaluó la utilidad de las VLPs quiméricas para la internalización de antígenos en macrófagos murinos. El resultado se comparó con la internalización de los antígenos solubles solos y en presencia de VLPs de CP TEV sin dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada.

La fagocitosis de proteínas quiméricas GFPEC y GFPEN como antígeno indicador se analizó por fluorescencia y microscopía confocal. La Figura 20 muestra los núcleos celulares teñidos con DAPI y la localización intracelular de perlas de látex marcadas con FITC como indicativo de la capacidad fagocítica de las células que se emplearon para el ensayo de internalización. Se observó la adecuada fagocitosis de las versiones quiméricas de GFP en macrófagos murinos; comparando los patrones de internalización de la proteína quimérica GFPEC, de la mezcla CP TEV-GFPEC y la mezcla TEVK-GFPEC (Figura 21a) se comprobó que la mezcla TEVK-GFPEC favorece la fagocitosis localizada de la proteína GFPEC en comparación con lo obtenido en presencia de las partículas de CP TEV sin dominio de interacción. Por otro lado, la comparación de los patrones de fagocitosis de proteína quimérica GFPEN, de la mezcla CP TEV-GFPEN y de la mezcla TEVK-GFPEC (Figura 21b), indican que la combinación de TEVK-GFPEN tiene un mejor resultado de fagocitosis en comparación con la fagocitosis observada en presencia de partículas CP TEV sin dominio. En ambos casos, se encontró favorecida la localización de la proteína en presencia de partículas en comparación con la proteína soluble. La dispersión intracelular de las proteínas quiméricas GFPEC como GFPEN al administrarse de forma independiente

es indicativo del efecto acarreador de proteínas en presencia de partículas quiméricas formadas por TEVK.



**Figura 20. Controles positivos en ensayos de fagocitosis.** a) Núcleos celulares teñidos con DAPI. b) Perlas de latex acopladas a FITC fagocitadas por macrófagos.



**Figura 21. Fagocitosis de antígenos favorecida por VLPs quiméricas.** Micrografías del ensayo de fagocitosis, la nomenclatura indica tratamientos en ausencia de VLPs y tratamientos con mezclas VLPs/antígenos. a) Fagocitosis de antígenos GFPEN (45 minutos). b) Fagocitosis de antígenos GFPEC (90 minutos). c: complejos fluorescentes contabilizados con un mínimo de 0.05 mm sobre la imagen.

## 10. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En vacunación se busca aprovechar las características de las VLPs para favorecer la respuesta del sistema inmune contra sí mismas o contra un antígeno acoplado en su superficie, de este modo se ha estudiado la generación de VLPs quiméricas que favorezcan la captación de los antígenos de interés por las CPAs e induzcan una respuesta de anticuerpos (Tissot, y otros 2010) (Kalnciema, y otros 2012).

La respuesta inmune así como la calidad de la respuesta de anticuerpos dependen en gran medida de la accesibilidad y plegamiento del epítipo o antígeno, desafortunadamente, la obtención de VLPs quiméricas acarreadoras de antígenos con los métodos actuales supone varios inconvenientes. En este trabajo se exploró el ensamblaje de VLPs acarreadoras de antígenos, obteniendo de forma independiente la CP que conforma las VLPs quiméricas y el antígeno a acarrear. Posteriormente, los dos componentes se acoplarían por medio de dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada dispuestos en cada especie proteica.

En orden de relevancia, se evidenció la formación de VLPs por la proteína quimérica TEVK (Figura 18) así como la obtención de proteínas fluorescentes con nuestras versiones de GFP que contienen dominios complementarios de  $\alpha$ -hélice superenrollada (Figura 17).

En este proyecto se logró la visualización de filamentos potyviraes que sugieren que se empaquetaron capsides virales completas y que están basadas en los constituyentes individuales (TEVK) que fueron producidos de forma recombinante. Este resultado concuerda con las imágenes de TEM obtenidas por Kalnciema y colaboradores donde muestran VLPs potyviraes filamentosas a partir de CP PVY. Por otro lado, las versiones de GFP demostraron que la inserción de dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada, ya sea en su extremo N o C, no altera negativamente su estructura tridimensional al no comprometer residuos intermedios en su secuencia, lo que se podría traducir en una baja posibilidad de efectos negativos de la inserción del dominio en la estructura de un antígeno distinto aprovechando alguno de sus extremos.

Las secuencias diseñadas para los dominios de hélice alfa superenrollada de este trabajo son secuencias heterodiméricas, constan de héptadas que integran en las



posiciones **e** y **g** residuos con la misma carga para dificultar la homodimerización. Los residuos **e** y **g** (residuos de lisina) del dominio de interacción en TEVK cuentan con una carga opuesta a la carga de los residuos **e** y **g** (residuos de ácido glutámico) en el dominio complementario presente en GFPEN y GFPEC. De este modo, se favorece la heterodimerización por atracciones electrostáticas ya sea en un acoplamiento paralelo o antiparalelo. Contemplando la posibilidad de un impedimento estérico, el diseño de las secuencias GFPEN y GFPEC cubre los dos tipos de acoplamiento.

Las VLPs TEVK obtenidas muestran la forma filamentosa que puede estar relacionada con la interacción natural entre los residuos implicados en el autoensamblaje de la CP, favorecida por los espaciadores flexibles colocados entre la secuencia de CP TEV y el dominio  $\alpha$ -hélice superenrollada. Adicionalmente, la morfología superficial variable (Figura 19) fue un resultado no esperado. Cabe considerar y evaluar la posibilidad de interacciones entre los dominios  $\alpha$ -hélice superenrollada de TEVK con residuos hidrofóbicos nativos de la CP y que pudieran generar núcleos hidrofóbicos, dando lugar a una forma superficial no uniforme. En la encapsulación de proteínas por medio de dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada utilizando la CP del Virus del Moteado Clorótico del Caupí (CCMV) se observó que la mezcla de CP quimérica con CP nativas da como resultado VLPs con morfología similar a la nativa (Minten, y otros 2011). Es probable que la mezcla entre especies quiméricas y nativas disminuya la cercanía entre dominios  $\alpha$ -hélice superenrollada de la TEVK y por lo tanto la interacción entre ellos y con otros residuos hidrofóbicos, favoreciendo así la estructura nativa de VLPs y la disposición adecuada de los dominios de interacción.

El uso de GFP como antígeno modelo se ha observado en estudios con distintas VLPs y partículas virales, ya sea para probar el efecto acarreador de éstas o su efecto adyuvante (Guerrero Rodríguez, y otros 2014) (Kratz, Böttcher y Nassal 1999). Cuando GFP se fusiona genéticamente a VLPs Q $\beta$  resulta en VLPs rugosas en comparación con las VLPs nativas. Esta observación se correlaciona con las protuberancias superficiales observadas en las mezclas TEVK-GFPEC y TEVK-GFPEN (Figura 19) (Kratz, Böttcher y Nassal 1999). Si bien, los monómeros de la TEVK podrían interactuar en distintas disposiciones tridimensionales dando lugar a las



correspondientes VLPs quiméricas con antígenos acoplados, el acoplamiento del antígeno indicador GFP a éstas generaría filamentos fluorescentes que proporcionarían evidencia directa acerca del acoplamiento de antígenos en la superficie de las VLPs quiméricas debido a la exposición de dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada, en nuestro caso GFPEN o GFPEC. Este resultado se evaluará posteriormente buscando una resolución adecuada para visualizar filamentos de  $\sim 1.0 \mu\text{m}$  de longitud.

Por otro lado y como se ha documentado, la captación de antígenos exógenos por macrófagos y su posterior procesamiento fagocítico es esencial en el inicio de la respuesta inmune, observándose mayor eficiencia para la exposición de antígenos vía MHC-I cuando éstos se presentan en forma particulada en comparación con su forma soluble. Al evaluar capacidad acarreadora de antígenos por las VLPs TEVK en ensayos de fagocitosis con mezclas de TEVK-GFPEN y TEVK-GFPEC, en ambos casos se encontraron complejos fluorescentes intracelulares de mayor tamaño en comparación con los encontrados cuando se adicionaron los antígenos en forma soluble o en presencia de VLPs TEV sin dominio de interacción (Figura 21).

De acuerdo con Kovacsovics y colaboradores, las partículas que tienen tamaños alrededor de  $\sim 1.0 \mu\text{m}$  corresponden a las que se internalizan ya sea por proceso de fagocitosis o probablemente macropinocitosis, sus hallazgos coinciden con la teoría acerca de que la presentación de antígenos exógenos vía MHC I es más eficiente en forma particulada, probablemente debido a una mayor captación de antígenos, siendo este efecto el equivalente en el reconocimiento de antígenos por el receptor de linfocitos B cuando son expuestos en las partículas (Kovacsovics-Bankowski, y otros 1993). Adicionalmente, se ha reportado la internalización de VLPs filamentosas como las procedentes de virus de ébola por CDs mieloides, llevando posteriormente a su activación, resultando en respuestas inmunes innatas y adaptativas (Bosio, y otros 2004). La internalización de VLPs se ha evidenciado a partir de 15 minutos de exposición sin encontrar variabilidad en la unión de VLPs a la superficie de CDs en tiempos prolongados, lo que podría indicar un máximo de capacidad de captación por parte de las células. En la internalización de VLPs HPV, se observó la fusión de

partículas en vesículas densas dentro de las células (Lenz, y otros 2001). En este caso, la formación de mayor número de complejos y de mayor tamaño en macrófagos estimulados con las VLPs quiméricas, sugiere la fagocitosis de los complejos TEVK-GFPEN y TEVK-GFPEC y con ello la utilidad del método propuesto para la generación de andamios acarreadores de antígenos, representando un nuevo enfoque nanotecnológico para el reconocimiento y posterior presentación de antígenos.

## 11. CONCLUSIONES

Las proteínas quiméricas TEVK, GFPEN y GFPEC se expresaron exitosamente en *E. coli* y se obtuvieron proteínas purificadas por IMAC usando iones  $\text{Ni}^{2+}$ .

La microscopía electrónica de transmisión mostró VLPs quiméricas formadas por la CP TEV con dominio de  $\alpha$ -hélice superenrollada, concluyendo que la inserción de este dominio permite el autoensamblaje en partículas quiméricas.

Se observó que las VLPs quiméricas favorecen la fagocitosis de antígenos en macrófagos murinos, visualizándose complejos intracelulares que sugieren la capacidad acarreadora de antígenos y aumento de la densidad de antígenos captados por las células en comparación con los antígenos solubles.

Finalmente, se concluye que la inserción de dominios  $\alpha$ -hélice superenrollada en el extremo N terminal de la proteína de la cápside del Virus del Grabado del Tabaco genera partículas quiméricas que favorecen la fagocitosis en macrófagos de antígenos con dominios complementarios, sugiriendo así la capacidad acarreadora de antígenos debido al motivo formado por ambos dominios.

## 12. PERSPECTIVAS

Determinar la interacción entre dominios de  $\alpha$ -hélice superenrollada presentes en las VLPs quiméricas y los antígenos de interés para confirmar la capacidad acarreadora de antígenos debido a estos dominios.

Evaluar la actividad fagocítica de macrófagos siguiendo una cinética, a fin de observar la internalización y degradación de antígenos.

Determinar la capacidad de activación de células presentadoras de antígenos, midiendo la expresión de moléculas y citocinas indicadoras de este proceso, para posteriormente determinar la capacidad para potenciar la respuesta protectora contra el antígeno acoplado.

Los análisis mencionados en este apartado y la incorporación de antígenos de interés permitirán corroborar la utilidad del método propuesto como una alternativa potencial para el desarrollo de nuevas vacunas.

### 13. REFERENCIAS

- Link, Alexander, Franziska Zabel, Yvonne Schnetzler, Alexander Titz, Frank Brombacher, y Martin F. Bachmann. «Innate Immunity Mediates Follicular Transport of Particulate but Not Soluble Protein Antigen.» *The Journal of Immunology*, 2012: 3724-3733.
- Phelps, Jamie P., Philip Dao, Hongfan Jin, y Lada Rasochova. «Expression and self-assembly of cowpea chlorotic mottle virus-like particles in *Pseudomonas fluorescens*.» *Journal of Biotechnology*, 2007: 290-296.
- Anassi, Enock, y Uche A. Ndefo. «Sipuleucel-T (Provenge) Injection.» *Pharmacy and Therapeutics*, 2011: 197-202.
- Bachmann, Martin F., y Gary T. Jennings. «Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns.» *Nature Reviews Immunology*, 2010: 787-796.
- Bosio, Catharine M., y otros. «Ebola and Marburg virus-like particles activate human myeloid dendritic cells.» *Virology*, 2004: 280-287.
- Brautigam, S., E. Snezhkov, y D.H. Bishop. «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*, 1993: 512-524.
- Brune, Karl D., y otros. «Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization.» *Scientific Reports*, 2016: 19234.
- Burkhard, Peter, Jörg Stetefeld, y Sergei V. Strelkov. «Coiled coils: a highly versatile protein folding motif.» *TRENDS in Cell Biology*, 2001: 82-88.
- Chackerian, Bryan. «Virus-like particles: flexible platforms for vaccine development.» *Expert Rev. Vaccines*, 2007: 381-390.
- Chen, Qiang, y Huafang Lai. «Plant-derived virus-like particles as vaccines.» *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2013: 26-49.
- Denis, Jérôme, y otros. «Immunogenicity of papaya mosaic virus-like particles fused to a hepatitis C virus epitope: Evidence for the critical function of multimerization.» *Virology*, 2007: 59-68.
- Einstein, M. H., M. Baron, M. J. Levin, y et al. «Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix(R) and Gardasil(R) human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18–45 years.» *Human vaccines*, 2009: 10.
- Finnen, Renée L., Kimberly D. Erickson, S. Chen Xiaojiang, y Robert L. Garcea. «Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins.» *JOURNAL OF VIROLOGY*, 2003: 4818–4826.
- Grgacic, Elizabeth V. L., y David A. Anderson. «Virus-like particles: Passport to immune recognition.» *Methods*, 2006: 60-65.

- Grigoryan, Gevorg, y Amy E. Keating. «Structural specificity in coiled-coil interactions.» *Curr. Opin Struct. Biol.*, 2008: 477-483.
- Guerrero Rodríguez, Jesús, y otros. «Virus-Like Particles from Escherichia coli-Derived Untagged Papaya Ringspot Virus Capsid Protein Purified by Immobilized Metal Affinity Chromatography Enhance the Antibody Response Against a Soluble Antigen.» *Mol. Biotechnol.*, 2014: 1110-1120.
- Harding, C. V., y R. Song. «Phagocytic processing of exogenous particulate antigens by macrophages for presentation by class I MHC molecules.» *The Journal of Immunology*, 1994: 4925-4933.
- Jegerlehner, Andrea, y otros. «A molecular assembly system that renders antigens of choice highly repetitive for induction of protective B cell responses.» *Vaccine*, 2002: 3104-3112.
- Jennings, Gary T., y Martin F. Bachmann. «The coming of age of virus-like particle vaccines.» *Biol. Chem.*, 2008: 521-536.
- Kalniciema, Ieva, Dace Skrastina, Velta Ose, Paul Pumpens, y Andris Zeltins. «Potato Virus Y-Like Particles as a New Carrier for the Presentation of Foreign Protein Stretches.» *Mol. Biotechnol.*, 2012: 129-139.
- Keating, G. M., y Noble S. «Recombinant hepatitis B vaccine (Engerix-B): A review of its immunogenicity and protective efficacy against hepatitis B.» *Drugs*, 2003: 1021-2051.
- Kovacsovics-Bankowski, Magdalena, Karen Clark, Baruj Benacerraf, y Kenneth L. Rock. «Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages.» *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993: 4942-4946.
- Kratz, Peter A., Bettina Böttcher, y Michael Nassal. «Native display of complete foreign protein domains on the surface of hepatitis B virus capsids.» *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999: 1915-1920.
- Kushnir, Natasha, Stephen J. Streatfield, y Vidadi Yusibov. «Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: Diversity of targets and production systems and advances in clinical development.» *Vaccine*, 2012: 58-83.
- Leclerc, Denis. US Patente US20100047264A1. 2010.
- Lenz, Petra, y otros. «Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells.» *The Journal of Immunology*, 2001: 5346-5355.
- Litowski, Jennifer R., y Robert S. Hodges. «Designing Heterodimeric Two-stranded alpha-Helical Coiled-coils.» *The Journal of Biological Chemistry*, 2002: 37272-37279.
- Mahanty, Siddharta, Antoine Prigent, y Olivier Garraud. «Immunogenicity of infectious pathogens and vaccine antigens.» *BMC Immunol.*, 2015: 16-31.
- Manuel Cabrera, Carlos Alberto, Alba Adriana Vallejo Cardona, Eduardo Padilla Camberos, Rodolfo Hernández Gutiérrez, Sara Elisa Herrera Rodríguez, y Abel Gutiérrez Ortega. «Self-assembly of hexahistidine-tagged tobacco etch virus capsid protein into microfilaments that induce IgG2-specific response against a soluble porcine

- reproductive and respiratory syndrome virus chimeric protein.» *Virology Journal*, 2016: 196.
- Manuel Cabrera, Carlos Alberto, y otros. «Immune response to a potyvirus with exposed amino groups available for chemical conjugation.» *Virology Journal*, 2012: 75.
- Matassov, D., A. Cupo, y J. M. Galarza. «A novel intranasal virus-like particle (VLP) vaccine designed to protect against the pandemic 1918 influenza A virus (H1N1).» *Viral Immunology*, 2007: 441-452.
- Mateu, Maurio G. « Assembly, Engineering and Applications of Virus-Based Protein Nanoparticles.» En *Protein-based Engineered Nanostructures. Advances in Experimental Medicine and Biology.*, de Maurio G. Mateu, 83-120. Springer, 2016.
- Maurer, Patrik, y otros. «A therapeutic vaccine for nicotine dependence: preclinical efficacy, and phase I safety and immunogenicity.» *Eur. J. Immunol.*, 2005: 2031–2040.
- Minten, Inge I., Victor I. Claessen, Kerstin Blank, Alan E. Rowan, Roeland J. M. Nolte, y Jeroen J. L. M. Cornelissen. «Catalytic capsids: the art of confinement.» *Chem. Sci.*, 2011: 358-362.
- Minten, Inge J. , Linda J. A. Hendriks, Roeland J. M Nolte, y Jeroen J. L. M. Cornelissen. «Controlled Encapsulation of Multiple Proteins in Virus Capsids.» *J. Am. Chem. Soc.*, 2009: 17771-17773.
- Monera, Oscar D., Nian E. Zhou, Cyril M. Kay, y Robert S. Hodges. «Comparison of Antiparallel and Parallel Two-stranded alpha-Helical Coiled-coils .» *The Journal of Biological Chemistry*, 1993: 19218-19227.
- Ormö, Mats, Andrew B. Cubitt, Karen Kallio, Larry A. Gross, Roger Y. Tsien, y S. James Remington. «Crystal Structure of the Aequorea Victoria Green Fluorescent Protein.» *Science*, 1996: 1392-1395.
- Park, Jae Keun, y otros. «Virus-Like Particle Vaccine Confers Protection against a Lethal Newcastle Disease Virus Challenge in Chickens and Allows a Strategy of Differentiating Infected from Vaccinated Animals.» *Clinical and Vaccine Immunology*, 2014: 360-365.
- Plotkin, Stanley A. «Vaccines: past, present and future.» *Nature Medicine*, 2005: S5-11.
- Roldão, A., A. C. Silva, M. C. M. Mellado, P. M. Alves, y M. J. T. Carrondo. «Viruses and Virus-Like Particles in Biotechnology: Fundamentals and Applications.» En *Comprehensive Biotechnology*, de Murray Moo-Young, 625-649. Elsevier, 2011.
- Roldão, António, Maria Candida M Mellado, Leda R Castilho, Manuel JT Carrondo, y Paula M Alves. «Virus-like particles in vaccine development.» *Expert Rev. Vaccines*, 2010: 1149-1176.
- Rossano, German L., y Eduardo A. Ceccarelli. «Recombinant protein expression in Escherichia coli: advances and challenges.» *Frontiers of microbiology*, 2014: 172.
- Sakuragi, S., T. Goto , K. Sano, y Y. Morikawa. «HIV type 1 Gag virus-like particle budding from spheroplasts of Saccharomyces cerevisiae.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002: 7956-7961.

- Shukla, D. D., M. J. Frenkel, y C.W. Ward. «Structure and function of the potyvirus genome with special reference to the coat protein coding region.» *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1991: 178-191.
- Shukla, D.D., P.M. Strike, S.L. Tracy, K.H. Gough, y C.W. Ward. «The N and C Termini of the Coat Proteins of Potyviruses Are Surface located and the N Terminus Contains the Major Virus-specific Epitopes.» *J. gen. Virol.*, 1988: 1497-1508.
- Smith, Douglas M. , Jakub K. Simon, y James R. Baker Jr. «Applications of nanotechnology for immunology.» *Nature Reviews Immunology*, 2013: 592-605.
- Smith, Mark L. , y otros. «Modified Tobacco mosaic virus particles as scaffolds for display of protein antigens for vaccine applications.» *Virology*, 2006: 475-488.
- Sun, Y., R. Jr. Carrion, y L. Ye. «Protection against lethal challenge by Ebola virus-like particles produced in insect cells.» *Virology*, 2009: 12-21.
- Tissot, Alain C., y otros. «Versatile Virus-Like Particle Carrier for Epitope Based Vaccines.» *pLoS ONE*, 2010: e9809.
- Voloudakis, A.E., C.A. Malpica, M.E. Aleman Verdaguer, D.M. Stark, C.M. Fauquet, y R.N. Beachy. «Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants.» *Arch. Virol.* , 2004: 699-712.
- Wilson, K. L., S. D. Xiang, y M. Plebanski. «Chapter Six: Adjuvants and Nanotechnology-The Secret to Vaccine Design.» En *MICRO- AND NANOTECHNOLOGY IN VACCINE DEVELOPMENT*, de Mariusz Kwarczynsky y Istvan Toth, 99-125. Elsevier, 2017.



## 14. ANEXOS

### Anexo 1. Asistencia a congresos

1. **Primer lugar en cartel:** Generación de una proteína quimérica de la cápside del virus del grabado del tabaco con posibles aplicaciones vacunales. Presentado en el XVII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Celebrado del 25-30 de Junio de 2017 en Puerto Vallarta, Jalisco.



**XVII**  
CONGRESO NACIONAL DE  
**BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA**

La Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C.  
otorga la presente

**Constancia**

A

Lorena Zapata Cuellar, Abel Gutiérrez Ortega, Carlos Alberto Manuel Cabrera,  
Jorge Gaona Bernal

por ser acreedores al *Primer Lugar de Cartel* del día jueves 29 de junio de 2017 con el trabajo:

**"GENERACIÓN DE UNA PROTEÍNA QUIMÉRICA DE LA CÁPSIDE DEL VIRUS DEL GRABADO DEL TABACO CON POSIBLES APLICACIONES VACUNALES."**

Puerto Vallarta, Jtl., 30 de Junio de 2017.

  
Dr. Carlos Regalado González  
Presidente de la SMBB-2016 - 2018

  
Dr. Adolfo Escalante Lozada  
Presidente del Comité Organizador 2016 - 2018

  
Dr. Nicolás Oscar Soto Cruz  
Presidente del Comité Científico 2016 - 2018

## Anexo 2. Solicitud de patente



**INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**  
 Dirección Divisiva de Patentes  
 OFICINA REGIONAL DE OCCIDENTE

Solicitud de Patente  
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:  
 Modelo Industrial     Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Sello

Folio de entrada  
 02174

Fecha y hora de recepción

Solicitud: **MX/a/2017/010654**  
 Expediente: **18/AGO/2017** Hora: **16:00:14**  
 Folio: **MX/E/2017/061212** 155213



Antes de llenar la forma lea las consideraciones generales al reverso

**I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

El solicitante es el inventor  El solicitante es el causahabiente

1) Nombre (s): CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ASISTENCIA EN TECNOLOGÍA Y DISEÑO DEL ESTADO DE JALISCO, A.C.  
 2) Nacionalidad (es): MEXICANA  
 3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: AV. NORMALISTAS 800, COLINAS DE LA NORMAL, C.P. 44270

Población, Estado y País: GUADALAJARA, JALISCO, MÉXICO  
 4) Teléfono (clave): (33) 33 45 52 00    5) Fax (clave): (33) 33 45 52 00 EXT 1001

**II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)**

6) Nombre (s): Abel Gutiérrez Ortega  
 7) Nacionalidad (es): MEXICANA  
 8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: AV. NORMALISTAS NO. 800, COL. COLINAS DE LA NORMAL, CP 44270  
 Población, Estado y País: GUADALAJARA, JALISCO, MÉXICO  
 9) Teléfono (clave):    10) Fax (clave):

**III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)**

11) Nombre (s): CARLOS OMAR AGUILAR NAVARRO Y/O CITLALLI HAIDÉ ALZAGA SÁNCHEZ    12) R G P:  
 13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: AV. NORMALISTAS No. 800 COL. COLINAS DE LA NORMAL, C.P. 44270

Población, Estado y País: GUADALAJARA, JALISCO, MÉXICO 14) Teléfono (clave): (33) 33455200    15) Fax (clave): (33) 33 45 52 00 EXT 1001  
 16) Personas Autorizadas para oír y recibir notificaciones:  
 ALEJANDRA NAVARRO HURTADO, NORMA ANGÉLICA PANIAGUA BUELNAS

17) Denominación o Título de la invención:  
 "SISTEMA BIMODULAR Y SU USO COMO ACARREADOR DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS"

18) Fecha de divulgación previa  
 Día | Mes | Año

19) Clasificación Internacional    uso exclusivo del IMPI

20) Divisiva de la solicitud    21) Fecha de presentación  
 Número | Figura jurídica | Día | Mes | Año

22) Prioridad Reclamada:  
 País | Fecha de presentación (Día | Mes | Año) | No. de serie

**Lista de verificación (uso interno)**

No. Hojas		No. Hojas	
1	Comprobante de pago de la tarifa	6	Documento de cesión de derechos
29	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material biológico
2	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
1	Documento que acredita la personalidad del apoderado		Traducción
		45	TOTAL DE HOJAS

**CONTINUACIÓN DEL RECUADRO I I**  
**DATOS DE (DE LOS) INVENTOR (ES)**

6) Nombre: Lorena Zapata Cuellar  
7) Nacionalidad (es): Mexicana  
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Pedro Ramírez No. 140  
Hogares del Batán C.P. 45190 Guadalajara, Jalisco. México.  
9) Teléfono (clave):  
10) Fax (clave):

6) Nombre: Jorge Gaona Bernal  
7) Nacionalidad (es): Mexicana  
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Normalistas No. 414 int.3  
Colinas de la Normal C.P. 44270 Guadalajara, Jalisco. México.  
9) Teléfono (clave):  
10) Fax (clave):

6) Nombre: Carlos Alberto Manuel Cabrera  
7) Nacionalidad (es): Mexicana  
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Felipe Carrillo Puerto 5162,  
El Colli CTM C.P. 45056, Zapopan, Jalisco, México.  
9) Teléfono (clave):  
10) Fax (clave):

6) Nombre: Moisés Martínez Velázquez  
7) Nacionalidad (es): Mexicana  
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Normalistas No. 800.  
Colinas de la Normal C.P. 44270 Guadalajara, Jalisco. México.  
9) Teléfono (clave):  
10) Fax (clave):

6) Nombre: Tanya Amanda Camacho Villegas  
7) Nacionalidad (es): Mexicana  
8) Domicilio; calle, número, colonia y código postal: Av. Normalistas No. 800.  
Colinas de la Normal C.P. 44270 Guadalajara, Jalisco. México.  
9) Teléfono (clave):  
10) Fax (clave):

GUADALAJARA, JALISCO, MÉXICO A 14 DE AGOSTO DEL 2017

---

CARLOS OMAR AGUILAR NAVARRO

### **Anexo 3. Memoria Técnica para solicitud de patente**

## **SISTEMA BIMODULAR Y SU USO COMO ACARREADOR DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS**

### **CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

La presente invención se dirige al campo de la biotecnología, especialmente a la producción de composiciones inmunogénicas, producción de anticuerpos, bioterapéutica y purificación de proteínas. Se trata de proteínas de la cápside de un potyvirus con la capacidad de autoensamblarse en partículas tipo virus (VLPs); estas proteínas incluyen un dominio de hélice alfa superenrollada en su superficie que interaccionan con una hélice alfa complementaria en una proteína o péptido de interés. El producto del autoensamblaje de las proteínas quiméricas de la cápside es utilizado como un agente acarreador de péptidos o proteínas por medio de motivos de hélice alfa superenrollada.

### **ANTECEDENTES**

Las partículas tipo virus (VLPs) se componen de proteínas virales estructurales que tienen la capacidad de autoensamblarse, imitando la morfología del virus del que proceden. En contraste con los virus activos, las VLPs no son infecciosas y no se replican ya que están desprovistas del material genético infeccioso. En comparación con los antígenos solubles, la estructura altamente repetitiva de las VLPs favorece el entrecruzamiento de epítomos y/o antígenos con los receptores de las células B y la inducción de la respuesta protectora de éstas células (Chakerian *et al.*, 2002, *The Journal of Immunology*, 169, 6120-6126; Jegerlehner *et al.*, 2002, *Vaccine*, 20, 3104–3112; Bachmann *et al.*, 1993, *Science*, 262, 1448-1451).

Debido a la propiedad de las VLPs de inducir una alta respuesta inmune, se ha estudiado su utilidad como andamios acarreadores de antígenos y epítomos de interés, obteniéndose vehículos capaces de exponer antígenos acoplados que derivan de otros patógenos. De hecho, existen ya en el mercado vacunas basadas en VLPs, éstas han demostrado ser seguras y eficaces en los seres humanos. Ejemplos de estas vacunas son las diseñadas para prevenir la Hepatitis B, entre ellas se encuentran; GenHevac-B, Engerix-B, Enivac-B, Recombivax HB. Otras vacunas profilácticas son Gardasil y Cervarix dirigidas a la prevención de infecciones por el virus del papiloma humano, Inflexal está orientada a la prevención de influenza (Kushnir *et al.*, 2012, *Vaccine*, 31, 58–83).

Así también existe el interés en el acoplamiento de enzimas y otras proteínas de interés en aplicaciones clínicas (Roldão *et al.*, 2010, *Expert Review of Vaccines*, 9 (10), 1149–1176).

Hasta el momento, los dos métodos comúnmente utilizados para el acoplamiento de péptidos o proteínas en VLPs son la fusión genética y la conjugación química por enlaces covalentes. A través de éstas técnicas se obtienen las partículas conocidas como VLPs quiméricas (Roldão *et al.*, 2010, *Expert Review of Vaccines*, 9 (10), 1149–1176).

Las VLPs quiméricas producidas por fusión genética, se obtienen clonando la secuencia de ADN codificante de los péptidos o proteínas en los genes que codifican el autoensamblaje de polipéptidos a VLPs. Tras el montaje de subunidades híbridas, los péptidos o proteínas introducidos se presentan de una manera repetitiva y ordenada, a relativamente alta densidad (1 copia por cada subunidad que conforma la VLP) e idealmente con la accesibilidad y la conformación óptima (Jennings & Bachmann, 2008, *Biol. Chem.*, 389, 521–536). La utilidad inmunogénica de las VLPs quiméricas obtenidas de este modo, se ha confirmado con varios ejemplos, entre los

que se encuentran los reportados por Tissot y colaboradores, (Tissot A. C. *et al.* 2010 PLoS ONE, 5(3), e9809), como el caso de la fusión de la proteína M2 al extremo N de la proteína de la cápside del bacteriófago AP205 ensamblados en VLPs dando como resultado una fuerte respuesta de anticuerpos específicos de M2 tras la inmunización, protegiendo al 100% de ratones retados con una infección letal por influenza.

Sin embargo, una limitante de las VLPs quiméricas obtenidas por fusión genética es que estas estructuras presentan a menudo impedimentos estéricos que limitan el tamaño de los péptidos que pueden incorporarse en la partícula permitiendo al mismo tiempo el ensamblaje de la cápside; además, en ocasiones el plegamiento del antígeno asociado es problemático, siendo casi imposible que adopte una estructura cuaternaria.

Lo anterior se ve reflejado en diversos ejemplos comprendidos en el estado de la técnica; por ejemplo en el documento de patente US20130052216A1, se describen proteínas quiméricas capaces de formar VLPs, estas proteínas están conformadas por la proteína de la cápside (CP) procedente de Calicivirus y uno o más antígenos incorporados mediante fusión genética en los extremos amino o carboxilo, e incluso sitios intermedios de la secuencia. Los antígenos asociados se presentan en la superficie de las VLPs formadas con las CP modificadas, sin embargo se observa que la longitud de los antígenos o fragmentos de antígenos fusionados son de tamaño limitado a un máximo alrededor de 70 residuos pudiendo incluir secuencias espaciadoras de hasta 10 aminoácidos o más.

Otro ejemplo se tiene en Kalnciema y colaboradores (Kalnciema, I., *et al.* 2012, Mol. 20 Biotechnol., 52,129-139), en donde se reporta la obtención de VLPs quiméricas mediante fusión genética, utilizando partículas filamentosas, particularmente utilizando la CP del virus Y de la papa (PVY) para la inserción de secuencias de aminoácidos de hasta 71 residuos. Como se refiere en este documento, la inserción de las secuencias

de aminoácidos en el extremo N-terminal de las proteínas CP no interfiere con el autoensamblaje de las partículas filamentosas para dar lugar a las VLPs quiméricas; sin embargo, la producción de VLPs quiméricas se ve drásticamente mermada cuando las secuencias se insertan en el extremo C-terminal, aún incluso tratándose de secuencias cortas. Otro aspecto desfavorable en relación a esta estrategia consiste en que es necesario desarrollar tanto el diseño como las condiciones del proceso de obtención de las VLPs quiméricas para cada epitopo de interés y/o cualquier péptido o proteína que se desee incorporar a dichas estructuras.

Intentos de vencer los aspectos desfavorables anteriormente referidos se conocen asimismo en el estado de la técnica; por ejemplo, en Kratz y colaboradores, (Kratz P.Z., et al, 1999, Proc. Natl. Acad. Sci., 96, 1915–1920), se describe que, anteriormente se conocía que el sitio inmunogénico c/e1 de la proteína de nucleocápside del virus de la hepatitis B (HBcAg) toleraba insertos de alrededor de 50 residuos como máximo para la formación de partículas; no obstante, Kratz y colaboradores lograron la inserción de la proteína verde fluorescente (238 aminoácidos) en el sitio c/e1 (residuos 79 y 80) empleando espaciadores flexibles, sin interferir con ello en la formación de estructuras secundarias comprometidas en el dominio de ensamblaje y que las partes individuales de las proteínas de fusión correspondientes pudieran plegarse adecuadamente. Aunque la estrategia diseñada por Kratz y colaboradores lleva a la obtención de VLPs quiméricas estables, aún con insertos muy por arriba de 50 residuos, persiste como una limitante, que tanto el diseño de las VLPs quiméricas como las condiciones para el proceso de obtención de las mismas deben adecuarse a cada tipo particular de péptido o proteína que se desea incorporar en las VLPs quiméricas. En consecuencia, no es posible asegurar en cada caso similar probabilidad de éxito en la obtención de las VLPs esperadas.

Por otro lado, se ha divulgado en el estado de la técnica el acoplamiento de péptidos y proteínas a VLPs por medio de técnicas químicas, como las reacciones de acilación de los grupos amino de las cadenas laterales de lisina y extremos N, alquilación de los grupos sulfhidrilo de cisteína, e incluso mediante la activación de residuos de ácido carboxílico. Se pueden emplear reactivos de conjugación heterobifuncionales que contienen dos grupos reactivos que se acoplan a objetivos funcionales distintos: uno en la VLP (comúnmente grupos amino o sulfhidrilo) y el otro en el antígeno (Roldão *et al.*, 2010, *Expert Review of Vaccines*, 9(10), 1149–1176). Aunque la conjugación química representa la estrategia más efectiva actualmente disponible para la funcionalización selectiva, uno de los principales inconvenientes es la dificultad para seleccionar las posiciones reactivas de los residuos de lisina o cisteína de interés. Se han observado problemas de estabilidad en bioconjugados obtenidos por este método debido a la difícil estimación de la capacidad de carga de las CP así como el difícil control de la reacción de acoplamiento (Guerrero *et al.*, 2014, *Mol. Biotechnol.*, 56,1110–1120).

Más ejemplos se tienen en los documentos de patente US20100047264A1, en donde se describe un sistema de antígenos conjugados por afinidad a partículas virales del virus del mosaico de la papaya (PapMV) o VLPs derivadas de la CP de este virus. Este sistema se basa en la utilización de secuencias de afinidad de naturaleza peptídica que se fusionan genéticamente a VLPs, o bien se unen químicamente a las partículas virales. Los péptidos de afinidad comprenden secuencias de siete residuos que se seleccionaron por la técnica de despliegue en fagos.

Y, el documento de patente WO2010047839A1 en donde se divulgan proteínas de la cápside del Virus del Moteado Clorótico del Caupí (CCMV) modificadas para obtener VLPs que empaquetan o entregan agentes terapéuticos y/o de diagnóstico. Este trabajo incluye el término “VLPs mosaico” en el que se contemplan dos o más proteínas



de la cápside viral en una sola partícula, todas las proteínas susceptibles de modificarse con supresiones o modificaciones en el extremo N para facilitar la carga de un agente heterólogo. En este caso se considera la presentación de moléculas en la superficie de VLPs ya sea por modificaciones genéticas o por acoplamiento químico.

Sin embargo; como ya se ha enfatizado anteriormente, el uso de las estrategias de fusión genética y conjugación química para utilizar a las VLPs como andamios para inducir una alta respuesta inmune contra péptidos y proteínas de interés presenta una serie de problemas técnicos que no permiten utilizar a plenitud las VLPs para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades. Por un lado, la estrategia de fusión genética garantiza que cada monómero que conforma la VLP lleva la secuencia del péptido y proteína pero ésta no puede ser muy larga para no comprometer el autoensamblaje de la partícula. Por otro lado, la estrategia de conjugación química permite el acoplamiento péptidos y proteínas más largos (antígenos completos) pero no garantiza que cada monómero que conforma la VLP lleve dicha secuencia, requiere de entrecruzadores químicos que aumentan el costo del desarrollo y es común que se tenga poco control sobre el proceso de conjugación, generando VLPs con poca estabilidad, lo cual es fundamental para una vacuna basada en subunidades.

Existen además otras alternativas que se han explorado y divulgado en el estado de la técnica, por ejemplo, en el documento de patente WO2008/094200A2 se describe y reclama un modelo de generación de VLPs quiméricas basadas en polipéptidos Gag, preferentemente provenientes de retrovirus, y polipéptidos asociados a balsas lipídicas a los que se unen antígenos, donde los antígenos pueden o no asociarse de forma natural a una balsa lipídica. Se aclara que los polipéptidos son co-expresados preferentemente en sistemas de expresión basados en células de mamífero o células de insecto, tras la expresión de los polipéptidos Gag en conjunto con los polipéptidos asociados a dominios de balsas lipídicas unidos a antígenos, se forman VLPs

quiméricas. Más aun, el éxito en obtener estabilidad, alto rendimiento y adecuada funcionalidad de las VLPs quiméricas, se ve en este caso condicionado a la correcta elección del sistema de expresión en células ya sea de mamífero, o de insecto; así como los métodos de cultivo y propagación de las mismas.

Sin embargo, como fue subrayado por Brune y colaboradores, (Brune K. D., et al, 2016, *Scientific Reports*, 6, 19234), otro aspecto desfavorable de las técnicas de producción de VLPs quiméricas divulgadas en el estado de la técnica está relacionado con el adecuado procesamiento en el sistema seleccionado para su expresión; es decir que podría ser el caso de que los requerimientos de modificaciones post-traduccionales de las VLPs fueran distintos a los requerimientos de modificaciones post-traduccionales del antígeno de interés, de modo que un óptimo hospedero para la producción de la VLP, podría no ser la mejor opción para el antígeno de interés, dando así lugar a la producción de una VLP quimérica deficiente o no funcional.

Por lo que, como una alternativa más, Brune y colaboradores proponen la expresión de la VLP de manera independiente de la expresión del antígeno de interés, y en un paso posterior llevar a cabo la unión de los mismos. Así, Brune y colaboradores reportan la obtención de VLPs del bacteriófago AP205 a las que se fusionan genéticamente péptidos llamados Spy-Catcher los cuales espontáneamente forman enlaces covalentes con un péptido complementario Spy-tag fusionado a un péptido (antígeno) de interés. Se demostró la unión de antígenos en VLPs del bacteriófago usando antígenos de malaria y cáncer. La proteína SpyCatcher está diseñada previamente para formar enlaces espontáneos e irreversibles cuando se mezcla con su péptido complementario SpyTag. Sin embargo, se observa la necesidad de utilizar una solución amortiguadora (“buffer”) de reacción para el acoplamiento de los antígenos a las VLPs, además de existir un remanente considerable de antígenos no acoplados. En otro aspecto, el modelo emplea VLPs esféricas de alrededor de 20 nm

de diámetro, no obstante, existen plataformas basadas en partículas filamentosas, las cuales representan una ventaja sobre las partículas esféricas debido a un mayor número de monómeros que componen la cápside y, por lo tanto mayor número de sitios a los que se pueden unir los antígenos de interés.

Ante los escenarios previamente descritos, los inventores de la invención objeto de esta solicitud detectaron que, pese a la ardua actividad en investigación y desarrollos relacionados al uso de VLPs quiméricas como sistemas acarreadores de péptidos o proteínas para su liberación como antígenos en aplicaciones biotecnológicas y farmacéuticas enfocadas a la generación de vacunas profilácticas o de terapia, no se encuentra aún en el estado de la técnica un sistema de esta naturaleza que ofrezca una solución completamente satisfactoria, permitiendo resultados óptimos al requerir una menor manipulación de las proteínas quiméricas, así como una fácil recuperación de las moléculas quiméricas producidas.

Una de las posibles aplicaciones de los sistemas antes descritos es, por ejemplo en el diseño de vacunas subunitarias, que representa una alternativa potencialmente más segura en comparación con las vacunas basadas en patógenos vivos o atenuados. Por otro lado, dichos sistemas resultan ventajosos por la flexibilidad en la creación de quimeras que puedan dirigirse tanto a antígenos y/o epítopos de patógenos como a auto-antígenos en el tratamiento de enfermedades crónicas. Así, mediante la presente invención se proporciona una alternativa que resuelve los problemas técnicos asociados a las dos estrategias más comunes de unir secuencias antigénicas a VLPs para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades. Adicionalmente, simplifica la unión de VLPs a cualquier antígeno completo mediante simple mezcla, a diferencia del uso de secuencias peptídicas cortas expuestas en las VLPs con afinidad hacia un solo antígeno, y reduce de forma significativa los tiempos y costos para la obtención de complejos VLP-antígeno.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN**

La invención provee un sistema bimodular acarreador de proteínas y péptidos, diseñado por ingeniería genética. De acuerdo con la invención, un primer grupo de proteínas quiméricas, con capacidad de autoensamblaje para producir VLPs quiméricas, filamentosas, forman un primer módulo del sistema bimodular; en tanto que, un segundo grupo de proteínas quiméricas que comprenden una secuencia proteica o péptido de interés, forman el segundo módulo del sistema bimodular de la invención. Las proteínas quiméricas del primer grupo se obtienen a partir de las proteínas de la cápside viral de miembros del género Potyvirus, incluyendo al virus del grabado del tabaco (TEV); virus Y de la papa; virus de la mancha anular de la papaya; entre otros Potyvirus que contengan el extremo N en la superficie de su cápside; extremo en el que de conformidad con la invención se une un dominio hélice alfa superenrollada.

Las proteínas quiméricas del segundo grupo se producen de manera que incluyan por lo menos una secuencia proteica o péptido de interés y un dominio hélice alfa superenrollada, unido en cualquiera de sus extremos N o C.

Las uniones de las proteínas quiméricas del segundo grupo con las proteínas quiméricas de las VLPs quiméricas en el primer módulo son mediadas por dominios de interacción que consisten en los dominios hélice alfa superenrollada, complementarios, dispuestos respectivamente en las proteínas quiméricas de ambos grupos. Los dominios de hélice alfa superenrollada comprenden una secuencia repetitiva patrón de aminoácidos, denominada de conformidad con la invención héptada de aminoácidos; y que según sea el caso corresponderá a la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID No:1 o SEQ ID No:2.

Entre las secuencias proteicas o péptidos de interés que pueden estar comprendidas en el segundo grupo de proteínas quiméricas se incluyen antígenos o epítomos provenientes de agentes patógenos como virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos, antígenos tumorales; auto-antígenos; alérgenos y toxinas.

El novedoso e ingenioso sistema bimodular acarreador de proteínas y péptidos de conformidad con la presente invención, puede ser utilizado para la elaboración de una gama de composiciones inmunogénicas; y/o para la producción de anticuerpos; y/o para el desarrollo y producción de vacunas de subunidades.

## **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

La **Figura 1**, muestra una representación gráfica de la configuración de secuencias que conforman las proteínas quiméricas: **A)** CPK, **B)** GFPEN, y **C)** GFPEC.

La **Figura 2**, muestra imágenes correspondientes a los geles de agarosa en donde se verifican las construcciones de los plásmidos: **A)** pET28-CPK, **B)** pET28-GFPEN, y **C)** pET28-GFPEC.

La **Figura 3**, muestra imágenes correspondientes a las membranas de nitrocelulosa en donde se confirma la expresión de las proteínas recombinantes: **A)** CPK, **B)** GFPEN, y **C)** GFPEC.

La **Figura 4**, muestra imágenes correspondientes a los geles de poliacrilamida en donde se confirma la purificación de las proteínas recombinantes: **A)** CPK, **B)** GFPEN, y **C)** GFPEC.

La **Figura 5**, muestra micrografías obtenidas por Microscopía Electrónica de Transmisión, en: **A)** el panel superior muestra VLPs quiméricas, filamentosas, formadas por las proteínas quiméricas CPK; en el panel inferior se muestran como referencia las VLPs de la proteína nativa CP TEV. **B)** VLPs de CPK en presencia de

las proteínas quiméricas GFPEN con dominio de hélice alfa complementario, y **C)** VLPs de CPK en presencia de las proteínas quiméricas GFPEC con dominio de hélice alfa complementario.

La **Figura 6**, muestra las micrografías del ensayo de fagocitosis. Las flechas indican en **A)** los núcleos celulares teñidos con DAPI, y en **B)** el control positivo de perlas de látex acopladas a FITC fagocitadas por macrófagos murinos.

La **Figura 7** muestra las micrografías del ensayo de fagocitosis. Las flechas señalan en los paneles de la fila **A)**, de izquierda a derecha, la proteína quimérica soluble GFPEC; la mezcla CP TEV/GFPEC; y el sistema bimodular acarreador CPK- GFPEC fagocitado por macrófagos murinos. En la fila **B)**, de izquierda a derecha, la proteína quimérica soluble GFPEN; la mezcla CP TEV/GFPEN; y el sistema bimodular acarreador CPK-GFPEN fagocitado por macrófagos murinos.

## **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION**

Minten y colaboradores reportaron el uso de un dominio de hélice alfa superenrollada para el encapsulamiento de enzimas en la cápside del CCMV; demostraron con este trabajo que los grupos N-terminales de la CP de virus que infectan plantas podían aprovecharse para la encapsulación de proteínas por heterodimerización dependiente de variaciones en el pH. Los autores orientaron su diseño primordialmente a la obtención de nanoreactores artificiales para encapsular múltiples proteínas en su interior y comprender mejor la actividad e interacciones de las enzimas en confinamiento (Minten *et al.*, 2011, *Chem. Sci.*, 2, 358-362).

La hélice alfa superenrollada es un dominio de espiral enrollada que forma y representa uno de los principales motivos de oligomerización en las proteínas. Su rasgo característico es un patrón de repetición de siete residuos, denominado

(*abcdefg*)<sub>n</sub>, son principalmente apolares que se alinean cuando la secuencia del péptido se pliega en la conformación helicoidal. La tira hidrófoba lateral formada posteriormente a un lado de la espiral enrollada, es la principal fuerza impulsora para el autoensamblaje de las dos especies y la estabilidad de los dominios de hélice alfa superenrollada se debe principalmente a un núcleo hidrofóbico formado por estas cadenas laterales (Burkhard *et al.*, 2001, *TRENDS in Cell Biology*, 11(2), 82-88; Minten *et al.*, 2009, *J. American Chemical Society*, 131, 17771–17773).

Los dominios de interacción de hélice alfa superenrollada ofrecen características atractivas para el diseño de proteínas ya que la secuencia de aminoácidos que conforma la héptada favorece o disminuye la especificidad entre hélices, las interacciones electrostáticas (principalmente entre residuos **e** y **g**) e hidrofóbicas (entre residuos **a** y **d**) juegan un papel importante en la estabilidad y especificidad (Grigoryan & Keating, 2008, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 18(4), 477-483).

Ahora bien, con respecto a la amplia gama de métodos reportados en el estado de la técnica para la obtención de VLPs quiméricas, se puede encontrar la evaluación de VLPs de diverso origen viral para su uso como andamios acarreadores de péptidos; encontrándose entre ellos VLPs de virus de mamíferos; de virus bacterianos; y también de virus de plantas. Además, en función del origen viral que dio origen a las VLPs, pueden producirse estructuras esféricas (de virus con cápsides icosaédricas) o filamentosas (de virus con cápsides helicoidales).

El número de monómeros que componen la cápside representa numerosos sitios disponibles para el acoplamiento de antígenos, por lo tanto, los virus filamentosos tienen una mayor ventaja respecto a los virus esféricos debido al montaje de hasta 2,000 copias de la proteína de la cápside.

Tomando como base los hechos previamente expuestos, y en el empeño de solventar los problemas técnicos asociados a las diferentes estrategias divulgadas en el estado

de la técnica para unir secuencias proteicas a las VLPs, por ejemplo la unión de antígenos para el desarrollo de vacunas basadas en subunidades, los inventores de la invención objeto de esta solicitud, idearon y desarrollaron un sistema bimodular acarreador de proteínas y péptidos, que incorpora la utilización de partículas tipo virus (VLPs), y que está conformado por proteínas quiméricas que cuentan con dominios de hélice alfa superenrollada, con lo que se elimina la necesidad de usar reacciones químicas, las cuales como ya se mencionó en el apartado de antecedentes, dificultan la selectividad para unir dos proteínas.

Para el desarrollo de dicho sistema bimodular acarreador de proteínas y péptidos, los inventores consideraron particularmente conveniente utilizar a los miembros del género *Potyvirus*, los cuales se caracterizan por formar partículas flexibles, no envueltas, filamentosas, que miden de 680 a 900 nm de largo y entre 11 a 15 nm de ancho. Las CP de *Potyvirus* poseen características interesantes que ofrecen potencial para su uso como portadores de antígenos: los extremos N y C terminales están expuestos en la superficie de las partículas infecciosas y presentan los epítomos más inmunogénicos. (Shukla *et al.*, 1988, *J. gen. Virol.*, 69, 1497–1508). De acuerdo con estudios realizados recientemente se conoce que la proteína de la cápside (CP) del virus de grabado del tabaco (TEV) presenta grupos amino terminales en la superficie de las partículas disponibles para el acoplamiento de antígenos. Se comprobó también que partículas virales del TEV inducen respuesta de las células T y la producción de anticuerpos a administrarse en ratones sin emplear adyuvantes (Manuel *et al.*, 2012, *Virology Journal*, 9, 75).

De acuerdo con el sistema bimodular de la invención, las VLPs quiméricas son producidas por el autoensamblaje de un primer grupo de proteínas quiméricas obtenidas a partir de las proteínas de la cápside de *Potyvirus*; a las VLPs quiméricas se une un segundo grupo de proteínas quiméricas que comprenden a su vez una



secuencia proteica o péptido de interés; dicha unión es mediada por dominios de hélice alfa superenrollada complementarios incluidos en las proteínas quiméricas. La utilidad se dirige a la decoración de VLPs únicamente por mezcla de las mismas con la secuencia proteica o péptido de interés mediante dominios de hélice alfa superenrollada. Su versatilidad se encuentra en la expresión independiente de las proteínas quiméricas, tanto la proteína de la cápside como la proteína quimérica que comprende la secuencia proteica o péptido de interés, permitiendo su plegamiento independiente para su posterior ensamble bimodular.

Así, en un aspecto de la invención, el sistema bimodular comprende un primer módulo que incluye proteínas quiméricas CPK obtenidas a partir de las proteínas CP de potyvirus, en las que se inserta un dominio de hélice alfa superenrollada en el extremo N. El dominio hélice alfa superenrollada consiste en una héptada de aminoácidos “KVSALKE” con cinco repeticiones. Entre la secuencia de la proteína CP y el dominio hélice alfa superenrollada (dominio de interacción) se incluye una secuencia espaciadora flexible “GGGGS” con tres repeticiones, para favorecer el correcto plegamiento de las proteínas CPK quiméricas y su autoensamblaje para dar origen a las VLPs quiméricas.

Otro aspecto de la invención comprende las VLPs quiméricas producidas por el autoensamblaje de las proteínas CPK quiméricas; los dominios de hélice alfa superenrollada quedan expuestos en la superficie de dichas VLPs quiméricas, de manera que es posible el acoplamiento con una hélice alfa complementaria, en una proteína o péptido de interés. Adicionalmente, se incluye en las proteínas quiméricas CPK una secuencia de seis histidinas (6His) para facilitar la ulterior purificación de las CPK y/o VLPs quiméricas producidas.

En otro aspecto de la invención, el sistema bimodular comprende un segundo módulo conformado por un segundo grupo de proteínas quiméricas que incluyen una

secuencia proteica o péptido de interés, y en la que se fusiona en cualquiera de sus extremos N o C una héptada de aminoácidos "EVSALEK" con cinco repeticiones, para conformar un dominio hélice alfa superenrollada; y, entre la secuencia de la proteína y el dominio hélice alfa superenrollada (dominio de interacción) se incluye una secuencia espaciadora flexible "GGGGS" con tres repeticiones y una secuencia de seis histidinas.

Las secuencias proteicas o péptidos de interés incluyen antígenos, toxinas y alérgenos. Antígenos de particular interés incluyen antígenos de agentes patógenos como: virus, bacterias, hongos, protozoos, helmintos; auto-antígenos; y antígenos tumorales. Opcionalmente, las secuencias proteicas o péptidos de interés incluyen epítomos de un antígeno determinado.

Otros aspectos y detalles característicos de la invención se harán evidentes mediante la descripción de una particular realización de la invención que se proporciona a continuación; y con un fin similar, se proporcionarán en los subsiguientes ejemplos de otras realizaciones particulares de la invención en donde se incluyen algunas de las actividades clave para la implementación de la invención en el sector industrial. Cabe señalar no obstante que en ningún caso deberá considerarse lo anterior como limitativo sino meramente ilustrativo.

## **MEJOR MÉTODO CONOCIDO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN**

### **Fase 1.- Diseño de las proteínas quiméricas, síntesis de su secuencia codificante y construcción del plásmido para su expresión.**

La proteína quimérica CPK fue diseñada a partir de la secuencia codificante para la CP del virus del grabado del tabaco (CP TEV) (GenBank: JX512813.1), incluyendo en su extremo N, la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID No:1 en el

listado de secuencias, con cinco repeticiones, la cual forma un dominio de hélice alfa superenrollada. Entre la secuencia de CP TEV y el dominio hélice alfa superenrollada se incluyó una secuencia espaciadora, correspondiente a la secuencia SEQ ID No.:3 del listado de secuencias, con tres repeticiones. Por separado y a partir de la secuencia de la proteína verde fluorescente (GFP) se diseñó la proteína quimérica GFPEN incluyendo en su extremo N, la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID No:2 en el listado de secuencias, con cinco repeticiones; y se incluyó una secuencia espaciadora correspondiente a la secuencia SEQ ID No.:3 del listado de secuencias, con tres repeticiones entre la proteína y el dominio hélice alfa superenrollada. De manera similar a GFPEN, se diseñó la proteína quimérica GFPEC en la que se incluyó la secuencia de aminoácidos identificada como SEQ ID No:2 en el listado de secuencias, con cinco repeticiones, en este caso en el extremo C; y se incluyó una secuencia espaciadora flexible correspondiente a la secuencia SEQ ID No.:3 del listado de secuencias, con tres repeticiones entre la proteína y el dominio hélice alfa superenrollada.

A partir de las secuencias de aminoácidos, se solicitó a la compañía Genscript la síntesis de las secuencias codificantes. Se adaptó el uso de codones de las secuencias codificantes para el modelo de expresión procariótico de *Escherichia coli* y se ajustó su contenido de guaninas y citosinas. Del mismo modo, se adicionaron los sitios de restricción NcoI y XhoI en los extremos 5' y 3' de la secuencia codificante, respectivamente, para facilitar su posterior inserción en el plásmido de expresión bacteriana. La secuencia codificante sintetizada se insertó en el plásmido pUC57 para su multiplicación. Se cortó la secuencia sintética del plásmido pUC57 con las enzimas de restricción NcoI y XhoI (New England Biolabs), se separó por electroforesis horizontal de ácidos nucleicos en gel de agarosa Tris-acetato-EDTA teñido con SYBR-

Safe (Thermo Fisher Scientific), se cortó del gel y se purificó con el kit MinElute Gel Extraction (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se realizó lo mismo con el plásmido pET28a+ (Merck-Millipore). Posteriormente, se ligó la secuencia codificante al plásmido con ligasa de DNA T4 (Promega). Los productos de ligación se usaron para transformar células electrocompetentes de la cepa Top10 de *E. coli* con el instrumento Gene Pulser II (Biorad), las cuales fueron esparcidas en placas con medio semisólido LB/agar (Sigma-Aldrich) suplementado con 50 µg/ml de kanamicina (Thermo Fisher Scientific) e incubadas a 37°C/18 h para la observación de colonias transformantes. Se aisló ADN plasmídico de algunas colonias transformantes con el kit GeneJet Plasmid Miniprep (Thermo Fisher Scientific) y se analizó por patrón de restricción con la enzimas XbaI y XhoI (Promega) en el sistema de fotodocumentación Gel Doc EZ System (Biorad) para confirmar las nuevas construcciones plasmídicas, designadas pET28-CPK, pET28-GFPEN y pET28-GFPEC.

## **Fase 2.- Expresión y purificación de las proteínas quiméricas.**

Para la expresión de las proteínas quiméricas, los plásmidos pET28-CPK, pET28-GFPEN y pET28-GFPEC se movilizaron a la cepa expresante BL21 Star (DE3) de *E. coli* mediante transformación de células quimio competentes y el crecimiento de las colonias transformantes.

A partir de colonias frescas que contenían los plásmidos pET28-CPK, pET28-GFPEN y pET28-GFPEC se prepararon cultivos de 4 ml de toda la noche, 2 ml de cada cultivo se colocaron en matraces de vidrio de 1000 ml con 200 ml de medio Terrific Modified (Sigma-Aldrich) para la expresión de CPK y medio LB Lenox (Sigma-Aldrich) para la expresión de GFPEN y GFPEC. Todos los cultivos se incubaron a 37°C/250 rpm hasta alcanzar una OD<sub>600</sub> de 1.0. La expresión de la proteína CPK se indujo con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido 1mM (Promega) por 16 h a 20°C. La expresión de las

proteínas GFPEN y GFPEC se indujo con 0.5 mM del mismo inductor por 5 h a 30°C. Todas las células se colectaron mediante centrifugación 4000xg/4°C/30 min. El paquete celular se resuspendió en 20 ml de solución amortiguadora de lisis (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM) y sonicó con pulsos repetidos de media intensidad de 15 seg en un sonicador Microson XL-2000 (Misonix). Los lisados se clarearon por centrifugación 4000xg/4°C/30 min y una solución de imidazol se agregó para obtener una concentración final de 5 mM en los extractos de CPK y GFPEC, 10 mM en los extractos de GFPEN. Se tomó una alícuota 30 µl del clareado (LSP) y 30 µl de pastilla remanente (PR) resuspendida en el volumen inicial con buffer de lisis para confirmar la expresión de la proteína quimérica. El volumen total de cada alícuota se mezcló con 10 µl de amortiguador de muestra de proteínas adicionado con 10% de β-mercaptoetanol y se calentó la mezcla a 95°C en baño maría por 5 min. Se tomaron 20 µl de cada mezcla y se colocaron en geles de poliacrilamida al 12% para someterlas a electroforesis SDS-PAGE, utilizando el sistema Mini-PROTEAN Tetra (Biorad). Todos los reactivos para electroforesis fueron adquiridos de Biorad. El gel se usó para realizar un análisis Western blot para el que las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm (Biorad) mediante electroforesis. La membrana fue bloqueada 1 h/37°C con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7.4 adicionada con leche descremada en polvo al 5% y Tween-20 al 0.05%. Después, la membrana fue lavada brevemente con PBS pH 7.4/Tween-20 al 0.1% (solución amortiguadora de lavado) e incubada toda la noche/4°C con anticuerpo monoclonal de ratón anti-His (Roche) diluido 1:500 en PBS pH 7.4/leche descremada en polvo al 5%/Tween-20 al 0.05%. La membrana se lavó 5 veces con solución amortiguadora de lavado, se adicionó conjugado de anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa de rábano (R&D Systems) diluido 1:1000 en PBS pH 7.4/leche descremada en polvo al 2.5%/Tween-20 al 0.05% y se incubó 3 h/temperatura ambiente. La membrana se lavó de nuevo 5 veces y se adicionó el

reactivo de desarrollo de color para peroxidasa de rábano (Biorad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La reacción colorimétrica se detuvo al lavar la membrana con agua destilada. Después de confirmar la expresión de las proteínas quiméricas, se realizó su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados en una columna HisTrap HP de 1 ml (GE Healthcare Life Sciences) como se describe a continuación.

Purificación de la proteína CPK: 20 volúmenes de columna del clareado se inyectaron en la columna, seguido de un lavado con 30 volúmenes de columna con solución de lavado 1 (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 200 mM, imidazol 40 mM), 20 volúmenes de columna de solución de lavado 2 (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 400 mM, imidazol 40 mM), 20 volúmenes de columna de solución de lavado 3 (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 600 mM, imidazol 40 mM) y 20 volúmenes de columna de solución de lavado 4 (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 800 mM, imidazol 40 mM), finalmente la proteína fue eluida con 10 volúmenes de columna de una solución que contenía Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 500 mM y colectada en fracciones de 1 ml.

Purificación de las proteínas GFPEN y GFPEC: 10 volúmenes de columna del clareado se inyectaron en la columna, seguido de 20 volúmenes de columna de solución de lavado (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 1 M, imidazol 40 mM) para GFPEN y 10 volúmenes de columna para GFPEC, finalmente la proteína fue eluida con 10 volúmenes de columna de una solución que contenía Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM, imidazol 500 mM y fue colectada en fracciones de 1 ml.

En todos los casos, las fracciones de elución con mayor concentración de proteína, lo que se determinó mediante SDS-PAGE y tinción con azul brillante de Coomassie, fueron mezcladas y se les realizó un intercambio de solución amortiguadora a Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM ó PBS pH 7.4, cloruro de sodio 500 mM con

unidades de filtración por centrifugación Amicon Ultra-15 (EMD Millipore) con membrana de corte de 10 kDa. Finalmente, las proteínas quiméricas se almacenaron a 4°C.

### **Fase 3.- Determinación de la estructura de VLPs quiméricas y estabilidad en presencia de proteínas con dominio de hélice alfa complementario**

Para confirmar la capacidad de autoensamblaje de la proteína quimérica CPK en VLPs; se prepararon composiciones de proteína a concentraciones de 200 µg/ml y se compararon con VLPs obtenidas de composiciones a la misma concentración de la CP TEV sin dominio de alfa hélice superenrollada. Además se prepararon composiciones mezclando la proteína quimérica CPK con las proteínas quiméricas GFPEN y GFPEC respectivamente en relación ~1:1 molar y concentraciones finales de 200 µg/ml de cada proteína. Todas las preparaciones se obtuvieron en solución amortiguadora (Tris 20 mM pH 8.0, cloruro de sodio 500 mM, EDTA 20 mM). Todas las preparaciones se colocaron en rejillas de cobre recubiertas de formvar y se tiñeron negativamente con una solución de acetato de uranilo al 2%. Las rejillas se analizaron por Microscopía Electrónica de Transmisión usando un equipo JEM-100C (JEOL, Japan).

### **Fase 4.- Análisis de internalización del sistema bimodular VLPs-proteínas quiméricas vs proteínas solubles en macrófagos murinos**

Para evaluar la internalización de proteínas y VLPs quiméricas se realizó un ensayo de fagocitosis, en el que se utilizó una línea celular de macrófagos murinos (RAW 264.7). La línea celular se mantuvo a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo MEM (Hyclone/GE) suplementado con 10% de SFB (GIBCO/BRL). El ensayo se realizó en placas de cultivo de 12 pozos, se colocó un cubreobjetos en el fondo de cada pozo y se sembraron 3x10<sup>5</sup> células en 800 µl de medio de cultivo por pozo. Se emplearon los siguientes tratamientos: 200 µl de PBS como control negativo, se utilizaron 1x10<sup>6</sup> perlas de látex de 1µm de diámetro acopladas a FITC (Molecular Probes) como control

positivo, 10 µg de CP TEV, 10 µg de la proteína CPK, 10 µg de la proteína GFPEC, 10 µg de la proteína GFPEN, 10 µg de cada proteína en una mezcla CP TEV/ GFPEC, 10 µg de cada proteína en una mezcla CP TEV/ GFPEN, 10 µg de cada proteína en una mezcla bimodular CPK/GFPEC, 10 µg de cada proteína en una mezcla bimodular CPK/GFPEN, todas las formulaciones de proteínas se prepararon en PBS (cloruro de sodio 500 mM, pH 7.4) y se adicionaron a cada pozo. Las células con los diferentes tratamientos se incubaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> por períodos de 45 y 90 minutos, posteriormente las muestras se lavaron dos veces con PBS, se fijaron con metanol enfriado previamente a -20°C y se lavaron dos veces más con PBS. Los cubreobjetos se montaron con medio de montaje Vectashild con DAPI (Vector) y las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Leica DM5500 Q (Leica) con un objetivo de inmersión de aceite 20x.

## **EJEMPLOS DE APLICACIÓN DE LA INVENCION**

### **Ejemplo 1. Inserción de dominios de alfa hélice superenrollada en proteínas de la cápside de potyvirus y proteínas de interés mediante la construcción de plásmidos recombinantes**

En el **panel A)** de la figura 1, se muestra una representación gráfica de la configuración de secuencias que conforman la proteína quimérica CPK, en dónde (KVSALKE)<sub>5</sub> corresponde a la secuencia del dominio de hélice alfa superenrollada como dominio de interacción, (GGGGS)<sub>3</sub> corresponde a la secuencia espaciadora flexible, CP corresponde a la proteína de la cápside de un Potyvirus (en este caso CP TEV) y 6His es una secuencia de seis histidinas que facilita la purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados. Los paneles **B) y C)** muestran representaciones gráficas de la configuración de secuencias que conforman las proteínas quiméricas GFPEN y GFPEC respectivamente, en dónde



(EVSALEK)<sub>5</sub> corresponde a la secuencia del dominio de alfa hélice superenrollada como dominio de interacción, (GGGGS)<sub>3</sub> corresponde a la secuencia espaciadora flexible, GFP corresponde a la proteína verde fluorescente como modelo de antígeno completo o proteína de interés y 6His es una secuencia de seis histidinas.

En la **figura 2** se muestra un patrón de restricción en gel de agarosa indicando que cada secuencia codificante de las proteínas quiméricas se pudo insertar en un plásmido para expresar proteínas recombinantes en *Escherichia coli*, en este caso, el plásmido pET28a+. Al cortar los plásmidos recombinantes pET28-CPK, pET28-GFPEN Y pET28-GFPEC que contienen la secuencia codificante de la respectiva proteína quimérica, con las enzimas de restricción XbaI y XhoI, se obtienen fragmentos con una longitud aproximada de 986 pb en el caso de la secuencia que codifica CPK (**panel A**, carril 2) y de aproximadamente 938 pb para los fragmentos que codifican GFPEN y GFPEC (**panel B y panel C**, carril 2 respectivamente). Para estimar la longitud de los fragmentos observados, se empleó como referencia una mezcla de fragmentos de tamaño conocido denominada 1 Kb PLUS DNA Ladder. La longitud de cada fragmento está indicada en kilopares de bases.

**Ejemplo 2. La proteínas quiméricas CPK, GFPEN y GFPEC se expresan en *Escherichia coli* y se purifican mediante cromatografía de afinidad a metales inmobilizados.**

Los plásmidos pET28-CPK, pET28-GFPEN y pET28-GFPEC están diseñados para expresar la proteínas quiméricas CPK, GFPEN Y GFPEC en presencia de la RNA polimerasa del bacteriófago T7, de tal forma que las proteínas quiméricas se pueden expresar en cualquier cepa de *Escherichia coli* que produzca, de forma constitutiva o inducible, la RNA polimerasa del bacteriófago T7, o bien, se puede expresar en presencia de un lisado bacteriano que contenga todos los elementos para la

transcripción y traducción genética procariótica y la RNA polimerasa del bacteriófago T7.

Se utilizó la cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli* para expresar las proteínas quiméricas CPK, GFPEN Y GFPEC a partir de los plásmidos pET28-CPK, pET28-GFPEN y pET28-GFPEC. La expresión de las proteínas quiméricas se realizó mediante la adición de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido a una concentración final de 0.5mM-1mM a un cultivo de la cepa BL21 Star (DE3) de *E. coli* conteniendo los respectivos plásmidos recombinantes en fase media logarítmica y la incubación del cultivo a 30°C/250 rpm por 5 h para expresar GFPEN y GFPEC, y 20°C/250 rpm por 16 h para expresar CPK. El **panel A)** de la **figura 3** muestra un ensayo tipo western blot donde se detectan proteínas CPK que contienen la secuencia de seis histidinas. Los **paneles B) y C)** de la **figura 3** muestran la detección de las proteínas quiméricas GFPEN y GFPEC respectivamente, ambas contienen etiqueta de histidinas. En todos los casos se observó la presencia de las proteínas quiméricas en las muestras lisadas y clareadas (LSP). Como referencia para estimar el tamaño de las proteínas observadas, se utilizó el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (M). En esta misma sección se describe el mejor método para purificar las tres proteínas quiméricas a partir de cultivos independientes de la cepa BL21 Star (DE3) de *Escherichia coli* conteniendo los plásmidos pET28-CPK, pET28-GFPEN y pET28-GFPEC. En la **figura 4** se muestran tres geles de poliacrilamida teñidos con azul de Coomassie en el que se colocaron muestras representativas de los distintos pasos para la purificación de las proteínas quiméricas: CPK (**panel A)**, GFPEN (**panel B)** y GFPEC(**panel C)** mediante cromatografía de afinidad a metales inmovilizados, como lisado y clareado sin purificar (LSP), fracción de lisado no retenido (NR), lavado (L ó L1, L2, L3, L4) y elución (E1, E2, E3, E4, E5 y E6). Se observa en esta figura que una fracción considerable de las proteínas

quiméricas se retienen en la columna durante los pasos de unión y lavado y que también una fracción considerable de la misma se eluyó de la columna en el paso final de purificación. Como referencia para estimar el tamaño de las proteínas observadas, se utilizó el marcador de peso molecular Unstained SDS-PAGE Standards, Broad Range (M).

### **Ejemplo 3. Caracterización de VLPs quiméricas formadas por CP potyviraes con dominios de hélice alfa superenrollada**

Para asegurar la expresión apropiada de las proteínas quiméricas potyviraes y la formación de VLPs con éstas subunidades así como su estabilidad frente a la interacción con otras proteínas quiméricas que presentan un dominio de hélice alfa complementario, se utilizaron métodos analíticos para la caracterización: SDS-PAGE, Western blot, diálisis con membranas de corte de 10 kDa que retienen las proteínas quiméricas con el peso adecuado y microscopía de electrónica de transmisión.

Estos métodos demostraron la expresión de proteínas con el peso molecular apropiado (**Figuras 4**) y la presencia de las etiquetas de histidinas que las caracterizan como proteínas recombinantes (**Figura 3**). El peso molecular de CPK (~35.8 kDa), GFPEN (~32.7 kDa) y GFPEC (~32.7 kDa) permite su retención al dializar los productos de purificación a través de membranas de con corte de 10 kDa. La utilidad de éste método para obtener VLPs quiméricas se demostró en la **figura 5, panel A**), donde se observa la formación de partículas filamentosas en preparaciones de proteínas quiméricas CPK al compararlas con preparaciones de CP TEV sin dominio de alfa hélice como partículas de referencia. También se confirmó que la presencia de las proteínas quiméricas GFPEN y GFPEC como componente de los sistemas bimodulares CPK-GFPEN (**panel B**) y CPK-GFPEC (**panel C**) continúa dando como resultado VLPs quiméricas. En todos los casos se observaron partículas filamentosas de longitud >1  $\mu\text{m}$ , confirmando que la proteína quimérica CPK que contiene el dominio de alfa hélice

formado por la repetición de la héptada de aminoácidos denominada “KVSALKE”, retiene la capacidad de autoensamblarse en VLPs incluso en presencia de las proteínas quiméricas GFPEN y GFPEC que contienen los dominios de hélice alfa superenrollada formado por la repetición de la héptada de aminoácidos denominada “EVSALEK” confirmando que la disposición del dominio en las proteínas que se acoplan a las VLPs quiméricas pueden orientarse en el extremo N o C en dependencia de la estabilidad de la proteína a acarrear sin comprometer la estabilidad de las VLPs.

#### **Ejemplo 4. Uso del sistema bimodular de VLPs-proteínas quiméricas para favorecer la fagocitosis de antígenos solubles en células del sistema inmune.**

Una realización particular del sistema bimodular acarreador de la invención, se probó en un modelo vacunal de fagocitosis de antígenos por células del sistema inmune innato con la finalidad de inducir una respuesta adaptiva contra los epitopos y/o antígenos acoplados al sistema. Se utilizaron para este fin macrófagos murinos, y la utilidad del sistema bimodular acarreador se evaluó mediante la comparación de la internalización de antígenos mediada por el sistema bimodular VLPs de proteína quimérica CPK-proteína quimérica GFPEC/GFPEN, y la internalización de las proteínas quiméricas GFPEC/GFPEN, solubles, solas, y en presencia de VLPs de CP TEV sin dominio de hélice alfa superenrollada.

En la **figura 6**, se muestran fotografías obtenidas por microscopía confocal, ambas funcionan como un control positivo de internalización. El **panel A)** muestra los núcleos celulares teñidos con DAPI para la posterior localización espacial de las proteínas fagocitadas. El **panel B)** indica fagocitosis de perlas de látex marcadas con FITC indicando la capacidad de las células que se emplearon para probar la internalización de las proteínas quiméricas, mezclas y sistemas bimodulares. En la **figura 7**, al comparar los patrones de internalización de la proteína quimérica GFPEC, de la mezcla CP TEV/GFPEC y el sistema bimodular CPK-GFPEC (**panel A)** a 90 minutos

se comprobó que el sistema bimodular CPK-GFPEC favorece la fagocitosis localizada de la proteína GFPEC en comparación con las partículas de CP TEV sin dominio. De forma similar, la comparación de los patrones de fagocitosis de la proteína quimérica GFPEN, de la mezcla CP TEV/GFPEN y el sistema bimodular CPK-GFPEN (**panel B**) a 45 minutos indican que el sistema bimodular CPK-GFPEN tiene un mejor resultado de fagocitosis localizada en comparación con la fagocitosis observada en presencia de partículas CP TEV sin dominio. En ambos casos (CPK-GFPEC y CPK-GFPEN) se favorece la localización de la proteína acarreada en comparación con la proteína soluble. La dispersión intracelular de las proteínas quiméricas GFPEC como GFPEN al administrarse de forma independiente comprueba que existe un efecto acarreador de proteínas en presencia de partículas quiméricas formadas por CPK.

Se comprobó que los sistemas CPK-GFPEC y CPK-GFPEN son fagocitados adecuadamente por macrófagos murinos representando un nuevo enfoque nanotecnológico para el reconocimiento y posterior presentación de antígenos.

## REIVINDICACIONES

1. Un sistema bimodular acarreador de proteínas y péptidos, diseñado por ingeniería genética, y que incorpora la utilización de partículas tipo virus (VLPs), caracterizado porque comprende: un primer módulo conformado por un primer grupo de proteínas quiméricas, con capacidad de autoensamblaje para producir VLPs quiméricas, filamentosas; y un segundo módulo conformado por un segundo grupo de proteínas quiméricas que comprenden una secuencia proteica o péptido de interés; en donde las proteínas quiméricas del segundo grupo se unen a las proteínas quiméricas de las VLPs quiméricas, para ensamblar el sistema bimodular acarreador de proteínas

y péptidos, mediante dominios de interacción que consisten en dominios hélice alfa superenrollada complementarios dispuestos respectivamente en las proteínas quiméricas de ambos grupos.

2. El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el primer grupo de proteínas quiméricas consiste en proteínas quiméricas CPK, producidas a partir de las proteínas de la cápside viral de Potyvirus (CP).
3. El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el Potyvirus es el virus del grabado del tabaco (TEV), virus Y de la papa o virus de la mancha anular de la papaya, entre otros potyvirus que contengan el extremo N en la superficie de su cápside.
4. El sistema bimodular de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 – 3, caracterizado porque las proteínas quiméricas del primer grupo comprenden un dominio hélice alfa superenrollada unido en su extremo N, y una secuencia espaciadora flexible dispuesta entre la secuencia de la proteína y el dominio hélice alfa superenrollada.
5. El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque el dominio hélice alfa superenrollada comprende una héptada de aminoácidos correspondientes a la SEQ ID No.1, con cinco repeticiones.
6. El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizado porque la secuencia espaciadora flexible comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID No.:3, con tres repeticiones.
7. El sistema bimodular de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 – 6, caracterizado porque las proteínas quiméricas del primer grupo incluyen además una secuencia de seis histidinas (6His) para facilitar la ulterior purificación de las proteínas y/o VLPs quiméricas.

8. El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el segundo grupo de proteínas quiméricas consiste de proteínas quiméricas que incluyen: secuencias proteicas o péptido de interés; un dominio hélice alfa superenrollada, unido en cualquiera de sus extremos N o C; y una secuencia espaciadora flexible dispuesta entre la secuencia proteica o péptido de interés y el dominio hélice alfa superenrollada.
9. El sistema bimodular de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1,8, caracterizado porque la secuencia proteica o péptido de interés incluye antígenos, toxinas y alérgenos.
- 10.El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque los antígenos de particular interés incluyen: antígenos de agentes patógenos como virus, bacterias, hongos, protozoos, y helmintos; auto-antígenos; y antígenos tumorales.
- 11.El sistema bimodular de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1, 8 – 10, caracterizado porque las secuencias proteicas o péptidos de interés incluyen epítomos de un antígeno determinado.
- 12.El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado porque el dominio hélice alfa superenrollada comprende una héptada de aminoácidos correspondientes a la SEQ ID No.2, con cinco repeticiones.
- 13.El sistema bimodular de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la secuencia espaciadora flexible comprende la secuencia de aminoácidos correspondiente a la SEQ ID No.:3, con tres repeticiones.
- 14.El sistema bimodular de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 8 – 13, caracterizado porque las proteínas quiméricas del segundo grupo incluyen además una secuencia de seis histidinas (6His) para facilitar su ulterior purificación.

15. Uso del sistema bimodular acarreador de proteínas y péptidos de las reivindicaciones 1 – 14, para la elaboración de composiciones inmunogénicas, producción de anticuerpos y/o vacunas de subunidades.

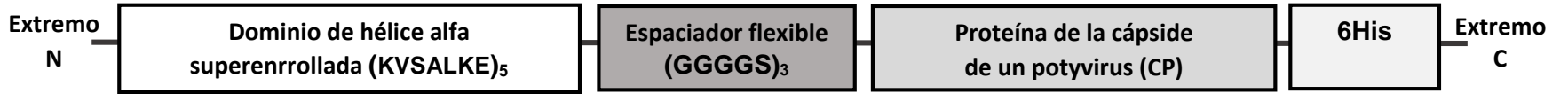
## **RESUMEN**

La presente invención se refiere a un sistema bimodular acarreador de secuencias peptídicas y proteicas empleando proteínas quiméricas. El sistema se compone por proteínas de la cápside de potyvirus que cuentan con un dominio de hélice alfa superenrollada fusionado en el extremo N formando VLPs quiméricas, a las partículas se unen proteínas o péptidos por medio de un dominio de hélice alfa superenrollada complementario fusionado en su extremo N o C. La utilidad se dirige a la decoración de VLPs únicamente por mezcla de las mismas con la secuencia peptídica de interés mediante motivos de hélice alfa superenrollada. Su versatilidad se encuentra en la expresión independiente de las proteínas quiméricas, tanto la proteína de la cápside como la proteína o péptido de interés permitiendo su plegamiento independiente para su posterior ensamble bimodular; lo que da lugar a la posibilidad de su uso en la elaboración y producción de una vasta gama composiciones inmunogénicas, anticuerpos, y/o para el desarrollo y producción de vacunas de subunidades.

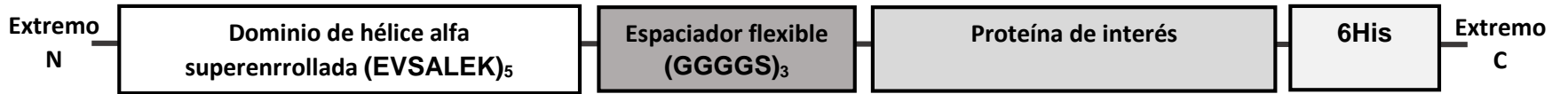


Anexo 4. Dibujos para solicitud de patente

A) CONFIGURACIÓN CPK



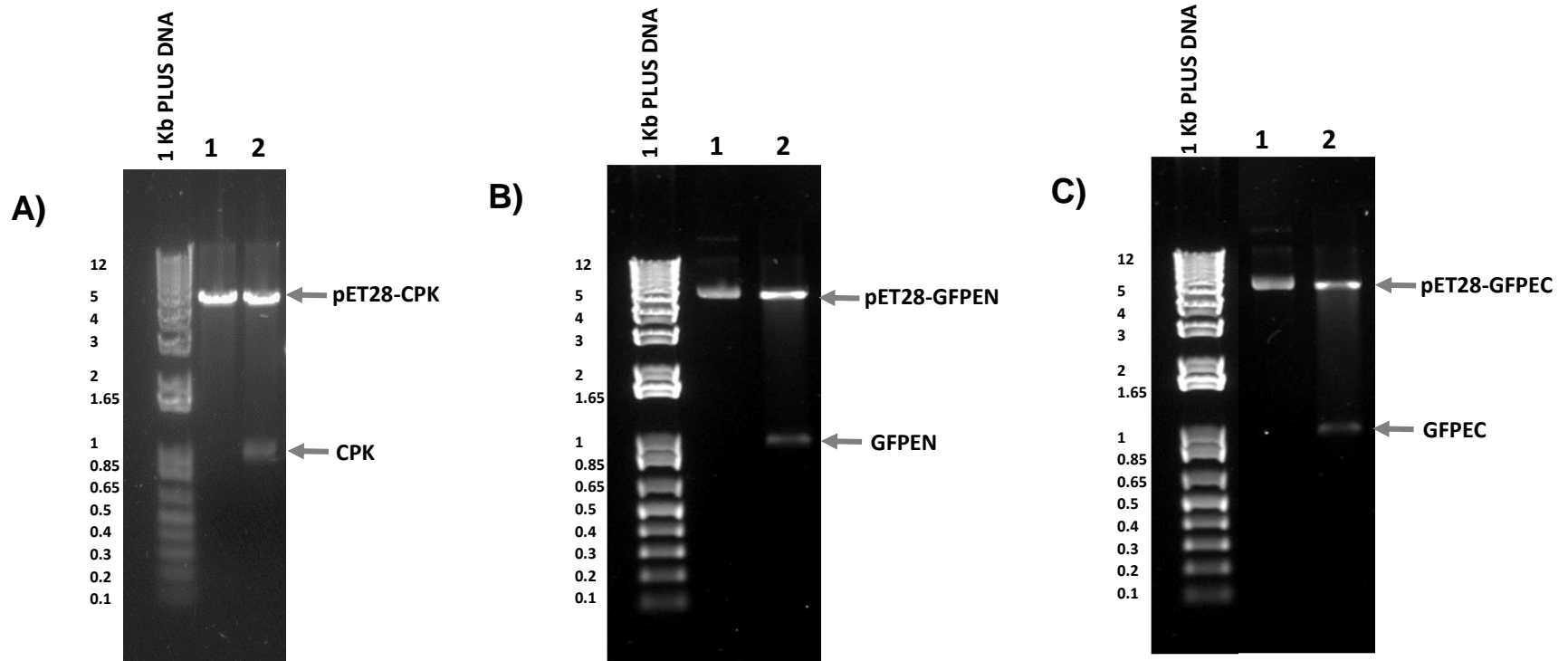
B) CONFIGURACIÓN GFPEN



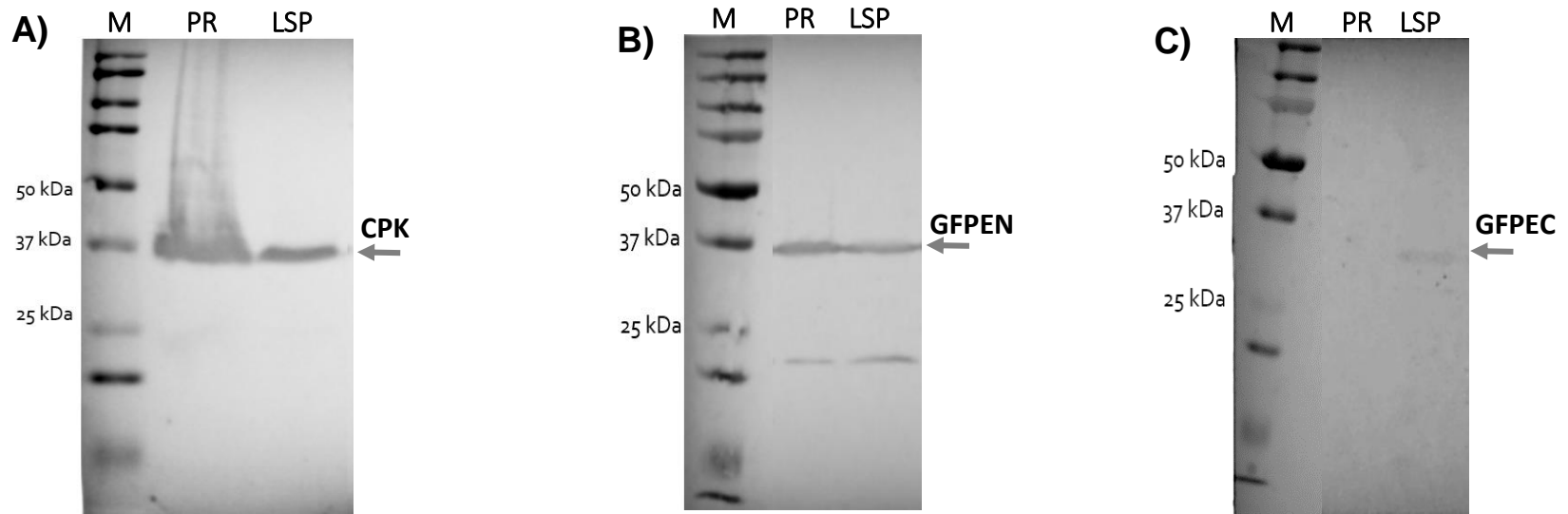
C) CONFIGURACIÓN GFPEC



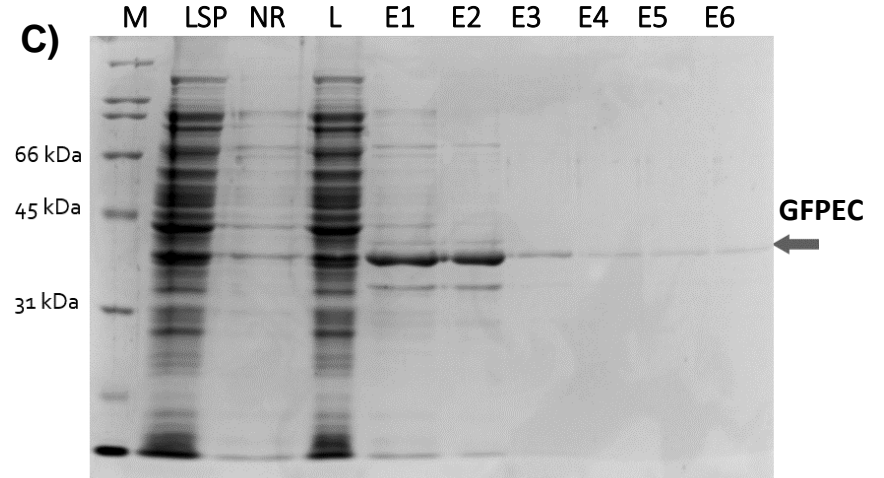
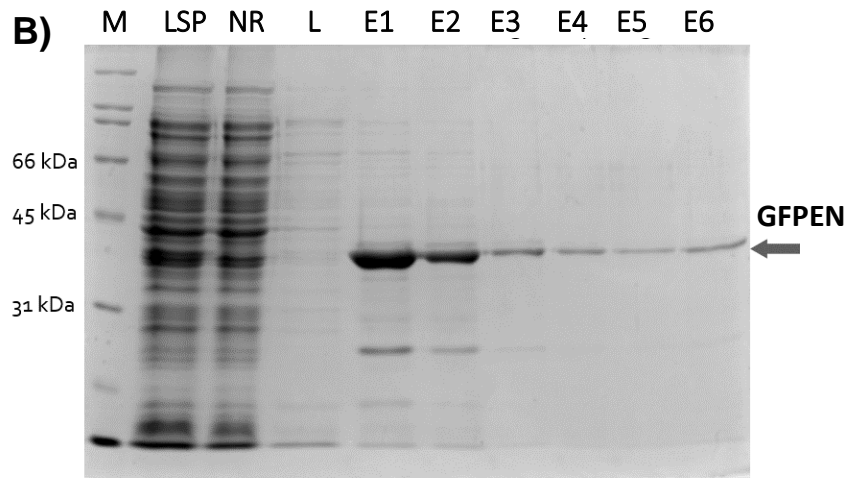
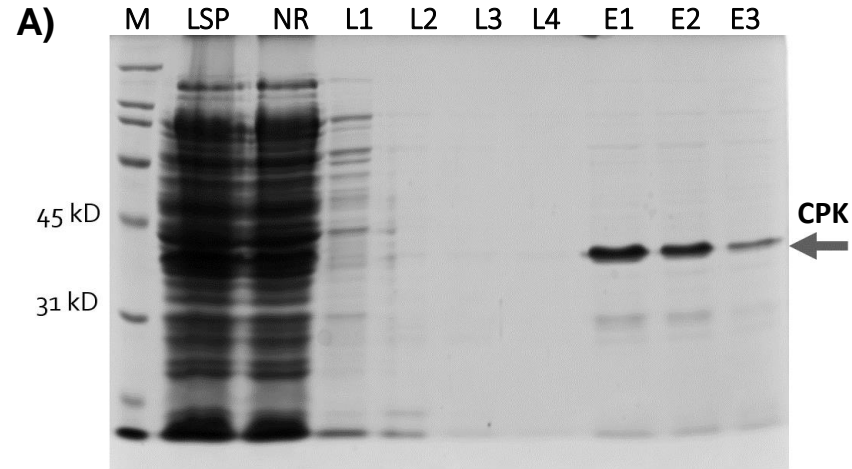
Figura 1



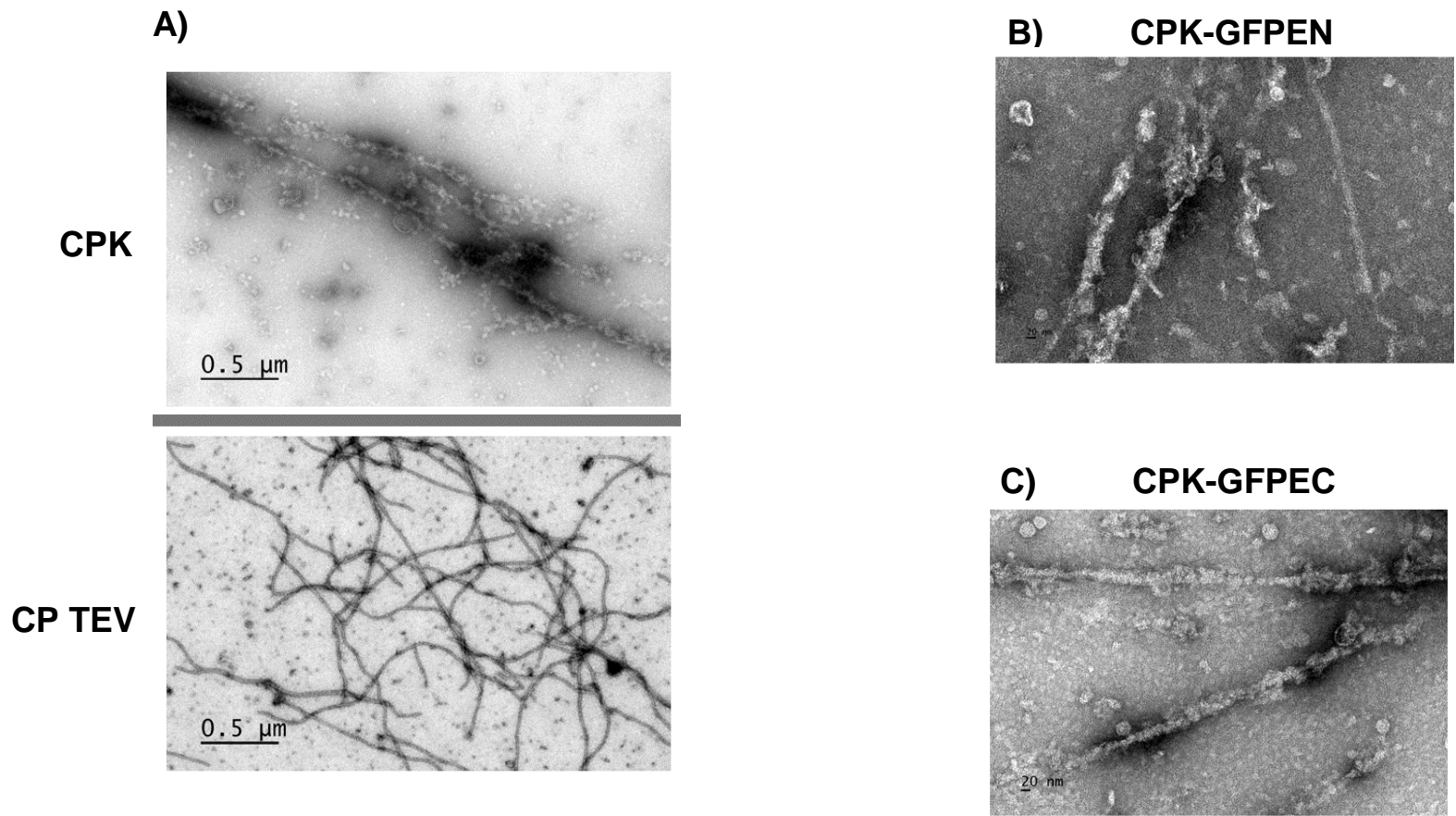
**Figura 2**



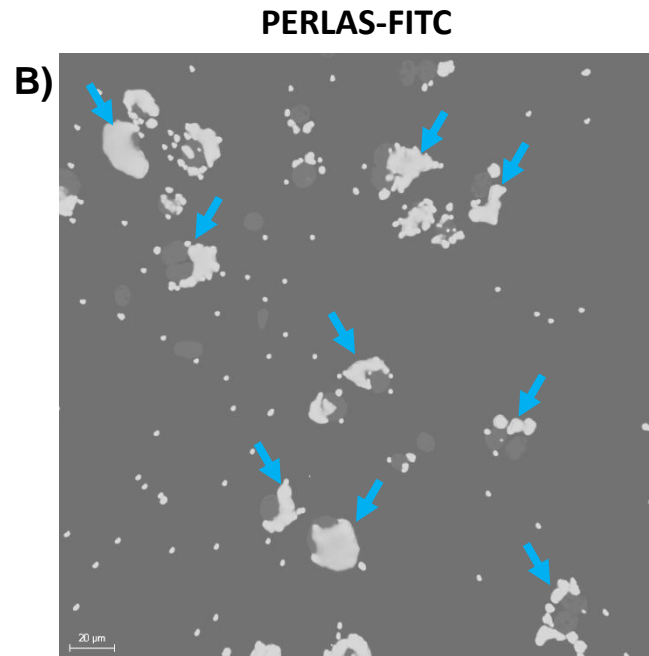
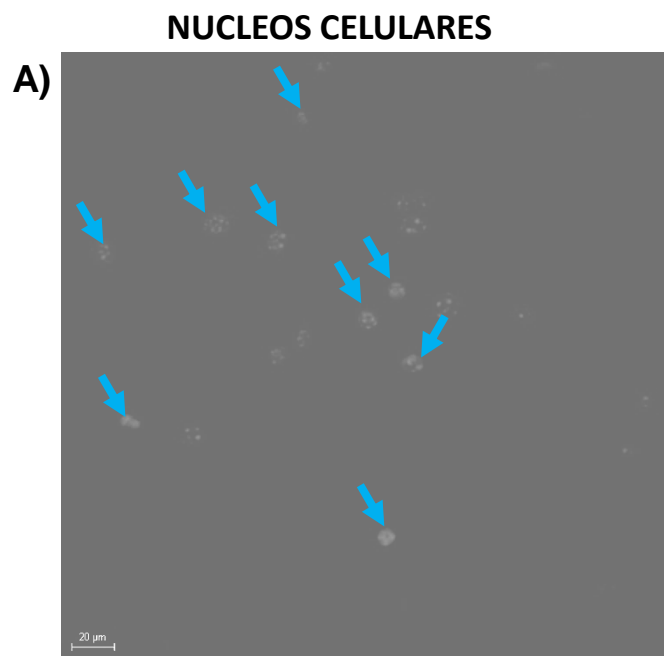
**Figura 3**



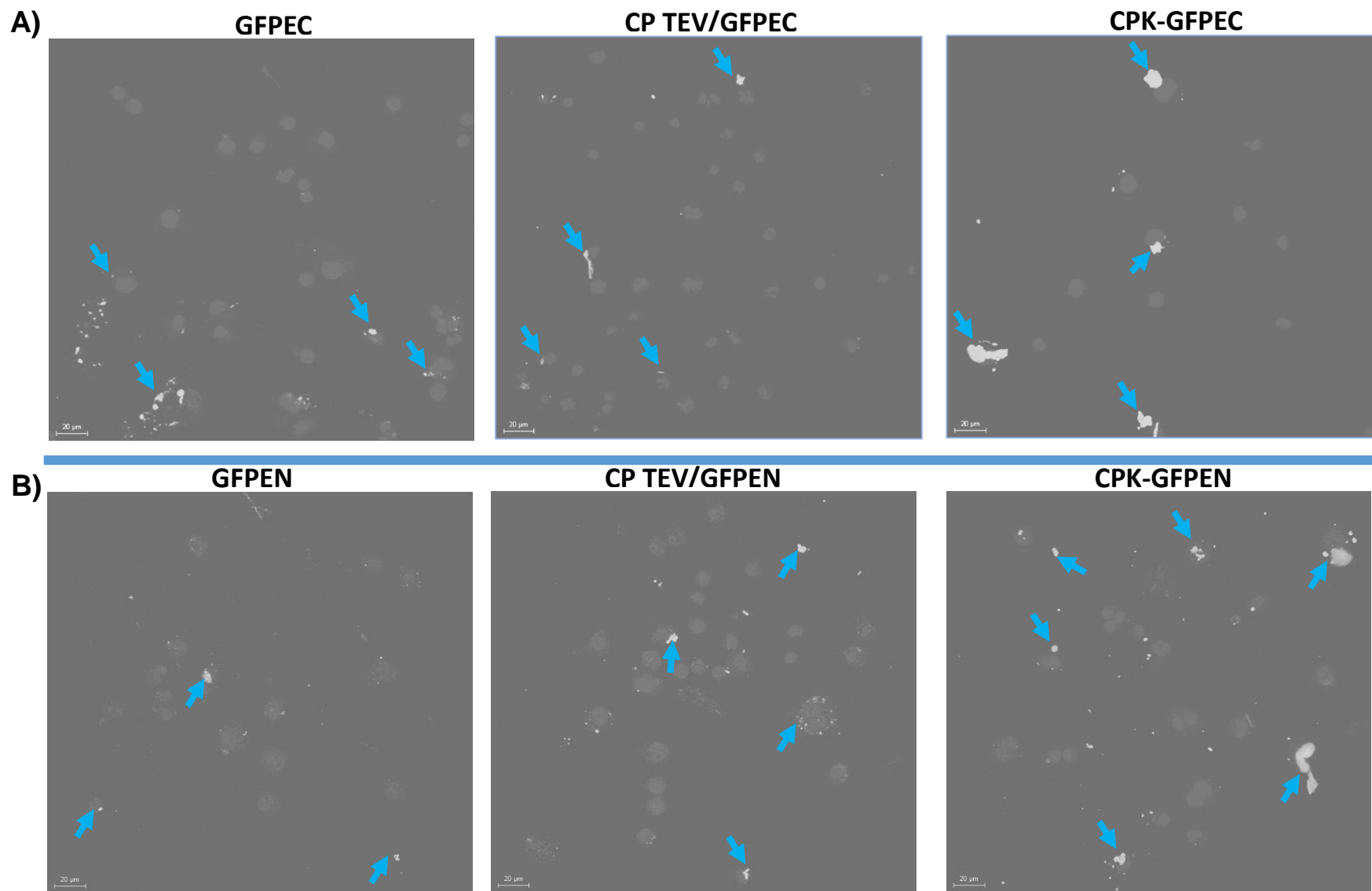
**Figura 4**



**Figura 5**



**Figura 6**



**Figura 7**

## Anexo 5. Listado de secuencias para solicitud de patente

### LISTADO DE SECUENCIAS

Número de secuencias: 3

Información para la SEQ. ID NO: 1

I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 residuos

(B) TIPO: aminoácidos

IX. CARACTERÍSTICAS

(A) Nombre: dominio hélice alfa superenrollada "KVSALKE"

X. SECUENCIA:

Lys Val Ser Ala Leu Lys Glu  
5

Información para la SEQ. ID NO: 2

I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 residuos

(B) TIPO: aminoácidos

IX. CARACTERÍSTICAS

(A) Dominio hélice alfa superenrollada "EVSALEK"

X. SECUENCIA:

Glu Val Ser Ala Leu Glu Lys  
5

Información para la SEQ. ID NO: 3

I. CARACTERISTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 residuos

(B) TIPO: aminoácidos

IX. CARACTERÍSTICAS

(A) Secuencia espaciadora flexible

X. SECUENCIA:

Gly Gly Gly Gly Ser  
5