



Caracterización y Desarrollo de *Virus Like Particles* (VLPs) del Bacteriófago MS2 con Capacidad de Carga Proteica

Tesis de Licenciatura en Biotecnología

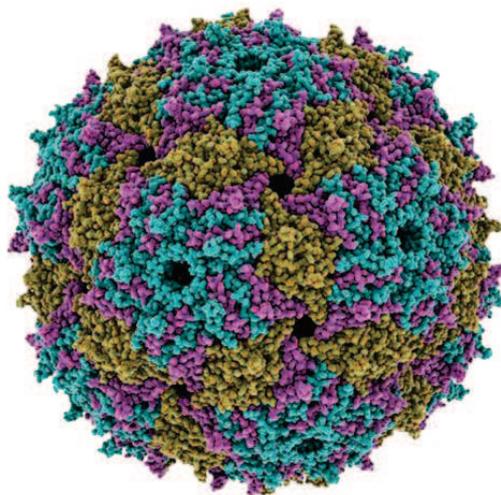
Alumno: Noriega Terán, Juan Cruz

Director: Dr. Viale, Diego

Co-director: Dr. Radrizzani, Martín

Lugar de Trabajo: CESyMA - ITECA - ECyT - UNSAM

Septiembre 2022



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a Dios por la vida misma y por todas las oportunidades que me dió. Gracias por el apoyo a toda mi familia, a mis hermanos y mención especial a mis papás, José y Raquel, que me acompañaron toda la vida, y también durante la carrera. Gracias a mi novia, Delfina y a todos mis amigos.

Quiero agradecerle especialmente a Diego por acompañarme durante todo este proceso de aprendizaje, gracias por la predisposición, por la paciencia, por todo lo aprendido, por el entusiasmo contagiado, por el gran acompañamiento y por transmitirme esa chispita curiosa necesaria para hacer ciencia. Gracias especiales a Martín Radrizzani, Nico Caffè y Nico Bruni por toda la buena onda y por recibirme con los brazos abiertos en el laboratorio, y sobre todo gracias a Mariano Grasselli, toda la segunda parte de esta tesis fue posible gracias a su dedicación y a su profesionalismo, gracias por la predisposición.

Gracias a la Universidad Nacional de San Martín por brindarme educación de primerísima calidad durante tantos años, gracias a todos los profesores, a los que trabajan en la Universidad, a mis compañeros y amigos, cada uno a su manera fue sumando a mi crecimiento como persona y como profesional.

RESUMEN

El cáncer de pulmón es responsable de 1,8 millones de muertes por año en el mundo, y los tratamientos existentes no son suficientes para contrarrestar esta enfermedad. El desarrollo de una plataforma versátil que permita transferir drogas quimioterapéuticas o proteínas recombinantes de manera específica a células tumorales y que, a su vez disminuya los efectos secundarios, podría mejorar la calidad de vida de muchas personas. Las *Virus Like Particles* (VLPs) son cápsides virales carentes de material genético viral que se autoensamblan a partir de una o varias proteínas estructurales. En particular, las VLPs derivadas del bacteriófago MS2 (VLPs-MS2) tienen un gran potencial terapéutico. El proyecto en el cual se encuadra esta tesis de licenciatura involucra el desarrollo de una plataforma basada en este virus de estructura simple. Las VLPs-MS2 pueden ser utilizadas como nanotransportadores para encapsular diferentes cargos terapéuticos en su interior y, mediante modificación externa de las cápsides, ser dirigidas hacia tejidos tumorales, disminuyendo los efectos colaterales.

En este trabajo, se optimizó la producción heteróloga en bacterias de las VLPs-MS2 mediante la puesta a punto de las condiciones de cultivo e inducción y mediante modificaciones en el vector de expresión. Estas últimas incluyen ediciones en la secuencia codificante, en el promotor T7 y en la Región de Inicio de la Traducción (TIR) para aumentar los niveles de expresión de proteína recombinante. También, se pusieron a punto 2 procesos de purificación de las VLPs-MS2, uno mediante Cromatografía de Exclusión Molecular y otro mediante Filtración de Flujo Tangencial y posterior columna de intercambio catiónica. Finalmente, como prueba de concepto de que estas VLPs-MS2 pueden transportar cargos, se diseñaron Quantum Dots para ser encapsulados por las VLPs-MS2. La producción a escala de este vector permitirá continuar con los ensayos necesarios para validar el uso de estas VLPs en el tratamiento del cáncer de pulmón.

INTRODUCCIÓN	6
Cáncer de Pulmón	6
Incidencia y Mortalidad	6
Tratamientos	7
<i>Virus Like Particles</i>	9
VLPs-MS2	12
Optimización de la expresión proteica	16
Quantum Dots	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
Obtención del plásmido pET21-dCP0	20
Cultivo de bacterias conteniendo el plásmido pET21-dCP	20
Minipreparación	21
Corte de ADN mediante la enzima de restricción <i>NdeI</i>	22
Purificación del ADN	23
Re-Ligación del plásmido	23
Preparación bacterias <i>E. coli</i> cepa DH5- α competentes	23
Transformación de bacterias <i>E. coli</i> cepa DH5- α	24
PCR de colonias	25
Obtención de plásmidos pET21-dCP2 y pET21-dCP1	25
Cultivo de bacterias conteniendo el plásmido pET28-mSA y Minipreparación	26
PCR para amplificar las regiones de interés	27
pET21-dCP2	27
pET21-dCP1	28
Ligación en vector pGEM-T y transformación (cepa DH5- α competentes)	28
PCR de colonias	29
Cultivo de bacterias conteniendo el plásmido pGEM-T y Minipreparación	29
Corte de ADN mediante las enzimas de restricción <i>KpnI</i> y <i>BglII</i>	29
Purificación de ADN	30
Ligación de los fragmentos de ADN y transformación (cepa DH5- α competentes)	31
PCR de colonias	31
Evaluación y comparación del crecimiento bacteriano	31

Cultivo de bacterias <i>E. coli</i> cepa DH5 α conteniendo los plásmidos de interés	31
Preparación de bacterias competentes <i>E. coli</i> cepa BL21(DE3) y transformación	31
Evaluación de crecimiento bacteriano a 37 °C y a 28 °C	31
Evaluación y comparación de la expresión mediante SDS-PAGE	32
Purificación de VLPs-MS2	33
Cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC)	33
Filtración de Flujo Tangencial (TFF)	34
Preparación de nanoestructuras en base a QDs	35
Mediante modificaciones químicas	35
Mediante sono-química	36
Desensamblado de VLPs-MS2 purificadas	37
RESULTADOS	38
Obtención de los plásmidos de interés	38
PCR de colonias bacterianas	38
Secuenciación	40
Evaluación y comparación del crecimiento bacteriano	42
Evaluación y comparación de la expresión mediante SDS-PAGE	43
Purificación de VLPs-MS2	46
Cromatografía de Exclusión por Tamaño Molecular (SEC)	46
Filtración de Flujo Tangencial (TFF)	51
Preparación de nanoestructuras en base a QDs	53
Desensamblado VLPs-MS2	56
DISCUSIÓN	57
Optimización de la producción de VLPs-MS2	57
Purificación de VLPs-MS2	60
Modificación de QDs y desensamblado de VLPs-MS2	65
CONCLUSIONES	67
BIBLIOGRAFÍA	68
ABREVIATURAS	75
ANEXO	76

INTRODUCCIÓN

Cáncer de Pulmón

El cáncer de pulmón se caracteriza por el crecimiento de células del tejido pulmonar de manera no controlada, derivando en la formación de un tejido anormal, denominado tumor. Las células que lo componen pueden desprenderse y trasladarse a tejidos cercanos o a otras partes del organismo, proceso denominado metástasis. Los síntomas más frecuentes son: tos con sangre, pérdida de peso, dificultad para respirar y dolores en el pecho².

Incidencia y Mortalidad

A nivel mundial, en el 2020 hubo 19,3 millones de personas diagnosticadas con cáncer, después del cáncer de mama, el segundo con más casos fue el cáncer de pulmón (11,4%). De las 10 millones de muertes que hubo en el 2020 por cáncer, el de pulmón fue la principal causal, abarcando el 18% de los casos (**Fig. 1**). Este cáncer, es el más frecuente en los hombres en términos de incidencia y mortalidad, y en las mujeres, tiene el tercer lugar en incidencia, y el segundo en mortalidad, detrás del cáncer de mama³.

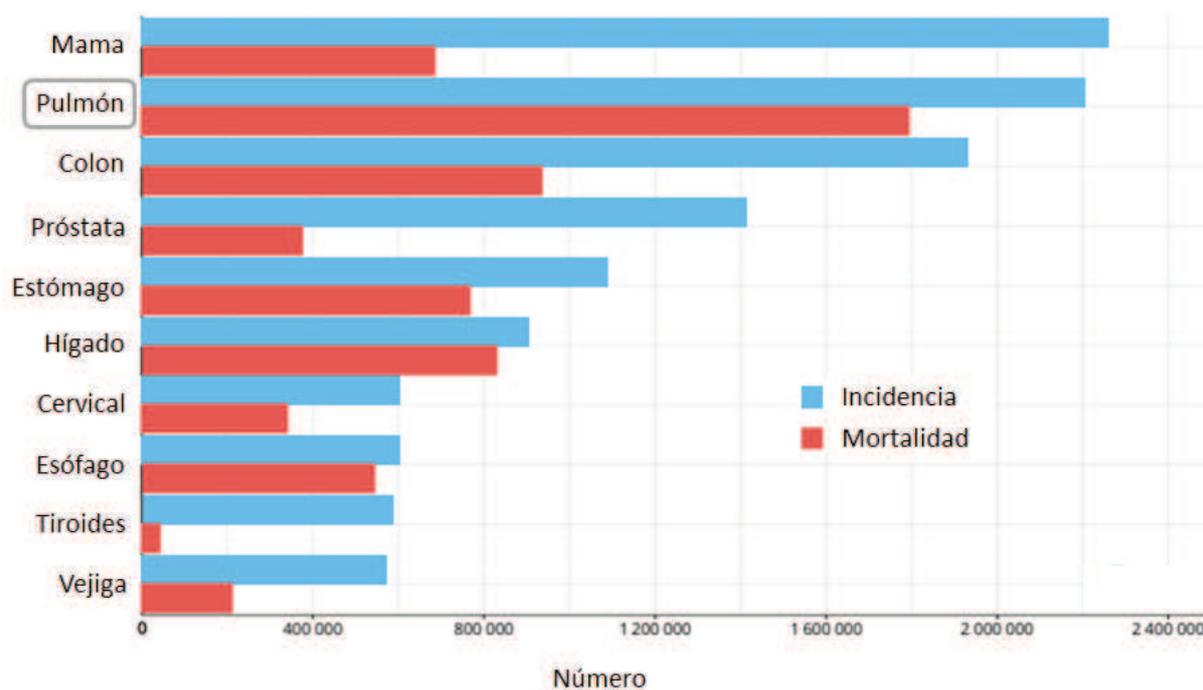


Figura 1: Número estimado de casos, según tipo de cáncer, de incidencia y mortalidad en el 2020.

En el eje Y se muestran los diferentes tipos de cáncer y en el eje X el número de casos (incidencia o mortalidad). El cáncer de pulmón es el primero en mortalidad, abarcando el 18% de los casos, y el segundo en incidencia. Adaptado del Global Cancer Observatory³.

Estudios recientes de Estados Unidos indican que, aunque la incidencia de esta enfermedad disminuyó (2015: 48,9 casos cada 100.00 habitantes/año) con respecto a

su pico en el año 1992 (65 casos/100.000 hab./año), los niveles actuales son mayores al año 1973 (47,5 casos/100.00 hab./año)⁴. Esta enfermedad continúa siendo la principal causa de muerte por cáncer en ese país en ambos sexos⁵ y la sobrevivida a 5 años de los pacientes desde 1973 a 2010, ha mejorado 26% para los subtipos tumorales menos agresivos y sólo un 7,2% para los más agresivos⁴.

En el caso de Argentina, de los 130.878 casos diagnosticados de cáncer en el año 2020, el 9,3% (n=12110) corresponde a cáncer de pulmón⁶. A su vez, del total de muertes causadas por cáncer, el de pulmón concentró el mayor porcentaje (15,3%, n=10.729). Siendo la principal causa en varones (19,3%) y la tercera en mujeres (11,2%)⁶. En Argentina, la mortalidad por cáncer de pulmón en varones se ha reducido en forma paulatina y sostenida desde 1980, mientras que en las mujeres se registra un leve ascenso⁷.

Con respecto a la sobrevivida a 5 años de los pacientes diagnosticados con esta enfermedad en nuestro país, la misma no ha mejorado e incluso ha disminuido (2000-2004: 19,5%; 2005-2009: 12,4%; 2010-2014: 13,1%). Mientras que, para los cánceres gastrointestinales, la sobrevivida en el período al menos se ha mantenido⁸. Según las predicciones del Observatorio Global del Cáncer, para el año 2040 se esperan 15.800 muertes por cáncer de pulmón para Argentina, mientras que en el 2020 fueron 10.700, es decir, se espera un 48% de aumento (**Fig. 2**)⁹. Todos los datos recopilados indican que la enfermedad está lejos de ser controlada actualmente; y el panorama a futuro parecería no ser favorable con las estrategias de tratamiento actuales.

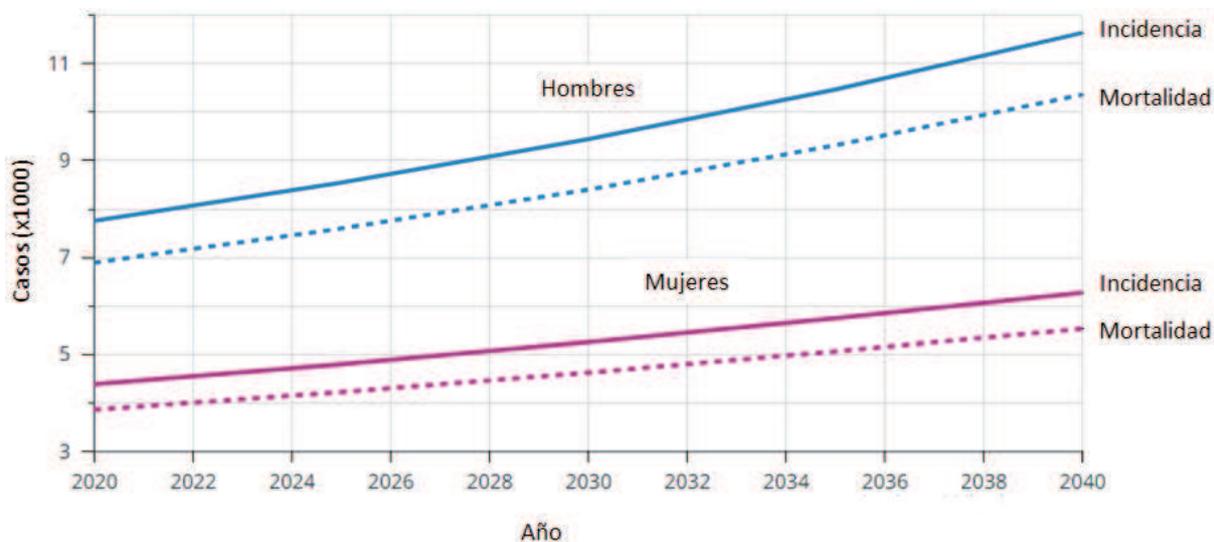


Figura 2: Proyección en Argentina de casos de cáncer de pulmón. En el eje Y se muestran los casos (x1000) y en el eje X los años. Adaptado de Global Cancer Observatory⁹.

Tratamientos

Alrededor del 85% de los casos de cáncer de pulmón son del tipo NSCLC (*Non Small Cell Lung Carcinoma*; Cáncer de pulmón de células no pequeñas)¹⁰, por lo que nos

centraremos en las terapias disponibles para este tipo de cáncer. El tratamiento principal en una etapa inicial de la enfermedad (Fases I y II)¹¹ consiste en una extracción del tumor mediante cirugía si el tumor es resecable. La supervivencia a 5 años es del 60% - 80% para los pacientes que están en Fase I y del 30% - 50% para los que están en Fase II. Se usa la radioterapia para los casos en los cuales no se puede hacer una cirugía debido a las condiciones del tumor (no resecable) o del paciente. Es importante destacar que más del 70% de los casos de NSCLC se diagnostican en la Fase III o en la Fase IV. La condición de la enfermedad en los pacientes en Fase III es muy variable, la supervivencia a 5 años para estos casos varía del 15% al 2%, según la condición del tumor y la posible metástasis. En la población heterogénea de los pacientes en Fase III las estrategias involucran el uso de radioterapia, quimioterapia, la combinación de ambas o una cirugía de resección del tumor si es posible. Para el caso de los pacientes en Fase IV la elección de tratamiento depende de varios factores incluyendo estado general de salud del paciente, comorbilidad, histología y factores genéticos del cáncer. Brevemente, las estrategias utilizadas involucran: radioterapia externa paliativa, quimioterapia combinada, terapia con láser, radioterapia endoscópica y terapia dirigida¹².

Con respecto a esta última, la terapia dirigida, aprovecha la expresión diferencial de alguna biomolécula en el tejido tumoral, logrando aumentar la especificidad y la concentración en el tejido diana y como consecuencia, reduciendo los efectos secundarios sobre el tejido normal. Esta novedosa estrategia ya tiene tratamientos aprobados, y tiene un futuro prometedor debido a que permite personalizar las terapias¹³. De todas maneras, las células tumorales suelen desarrollar resistencia. Ejemplo de esto, son los inhibidores de los receptores tirosin quinasa, como el gefitinib o el erlotinib (inhibidores de la tirosin-quinasa de 1.^a Generación), que se unen reversiblemente a los receptores del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) e inhiben su actividad. Aunque inicialmente se observaba en los pacientes una remisión del tumor, al tiempo comenzaba a crecer nuevamente. A partir de la descripción de las vías de escape tumoral, se desarrollaron nuevas generaciones de este principio activo y actualmente se encuentran en desarrollo los inhibidores de la tirosin-quinasa de 4.^a generación¹⁴.

Aunque estas terapias dirigidas han mejorado la calidad de vida de los afectados, el tumor generalmente logra encontrar una vía de escape a estos tratamientos. Las drogas mencionadas tienen pocos efectos secundarios debido a que se unen específicamente a EGFR mutado de las células tumorales. Sin embargo, muchos otros principios activos utilizados necesitan ser específicamente dirigidos al tejido tumoral para disminuir los efectos secundarios, e incluso de esta manera los tumores también generan resistencia¹⁵. El desarrollo de vectores de transporte al tejido específico que permiten encapsular diferentes cargos (drogas quimioterapéuticas, biofármacos, etc.) puede disminuir los tiempos de desarrollo de nuevas terapias. El objetivo general del proyecto

en el cual se enmarca esta tesis de licenciatura es la generación de vectores que permitan transferir cargos terapéuticos para el tratamiento del cáncer de pulmón.

En los últimos años se ha regulado el uso de numerosos biofármacos para el tratamiento de diferentes enfermedades¹⁶, estos pueden ser proteínas recombinantes, citoquinas, hormonas, anticuerpos monoclonales, terapias basadas en ácido desoxirribonucleico (ADN)/ácido ribonucleico (ARN), etc¹⁷. A pesar de su especificidad y potencia, son estructuras más complejas que las drogas, por lo que su formulación, entrega y regulación suele ser un desafío¹⁸. El uso de nanopartículas para transportar biofármacos surgió como una alternativa para contrarrestar las dificultades del uso terapéutico de estas estructuras, debido a que permite modificar sus propiedades y de esta manera optimizar su farmacocinética. La utilización de nanopartículas para transportar tanto biofármacos como drogas quimioterapéuticas está mostrando resultados muy prometedores^{19,20}. Con esta estrategia, se busca lograr una mayor concentración en el tejido diana, reducir la toxicidad sistémica, mejorar la solubilidad y estabilidad, sobrepasar las barreras del sistema inmune y/o generar mejores imágenes de diagnóstico²¹⁻²³. Un tipo particular de nanotransportadores que se encuentran en fase avanzada de desarrollo son las cápsides virales carentes de material genético, conocidas como *Virus Like Particles* (VLPs)

Virus Like Particles

Estas estructuras están usualmente formadas por muchas subunidades de una o más proteínas estructurales que se auto-ensamblan²⁴. Las VLPs tienen una estructura y una antigenicidad similar a la de los virus nativos²⁵, y se pueden producir mediante ingeniería genética expresando las proteínas recombinantes virales en una variedad de sistemas: incluyendo bacterias²⁶, levaduras²⁷, células de insectos²⁸, de mamíferos²⁹, de plantas³⁰ e incluso mediante síntesis proteica libre de células (CFPS)^{31, 32}. Estas nanopartículas generalmente tienen un tamaño de entre 20 y 200 nm³³. Las VLPs se pueden utilizar como nanotransportadores, ya que, por un lado, permiten encapsular drogas terapéuticas^{34,35}, proteínas recombinantes³⁶, moléculas de ADN o ARN³⁷, etc.; y por otro lado es posible modificar genética o químicamente la superficie con ligandos específicos para células o tejidos diana³⁸. También se utilizan para el desarrollo de vacunas, debido a que son más seguras que las vacunas tradicionales que utilizan virus inactivados o atenuados. La ventaja es que se puede modificar su superficie para presentar diferentes clases de epítopes^{39,40}. Numerosos estudios demostraron que estas nanopartículas activan las células B, y generan una alta producción de anticuerpos⁴¹. Incluso también estas estructuras pueden ser procesadas por células presentadoras de antígeno y activar las células T⁴².

Actualmente, hay 6 vacunas aprobadas que utilizan VLPs, 3 de ellas actúan contra el Virus del Papiloma Humano (HPV): Gardasil⁴³, Gardasil9⁴⁴ y Cervarix⁴⁵. También hay una vacuna contra la Hepatitis B, llamada Prehebro⁴⁶, otra contra la Malaria,

Mosquirix⁴⁷, y recientemente contra el SARS-CoV2, llamada COVIFENZ⁴⁸. También hay numerosos ensayos clínicos que utilizan VLPs para enfermedades como la inmunodeficiencia humana (VIH), hepatitis E, COVID-19, virus sincitial respiratorio, influenza humana, ébola y muchas otras³³, indicando que los desarrollos utilizando esta estrategia abarcan diversas enfermedades.

Numerosas VLPs fueron desarrolladas a partir de las proteínas virales del virus del VIH⁴⁹, adenovirus⁵⁰, virus de la Hepatitis B⁵¹, virus de la Hepatitis C⁵² y bacteriófagos⁵³. La variedad de estructuras adoptadas por las diferentes VLPs desarrolladas las convierte en plataformas atractivas debido a su versatilidad funcional y estructural. Basado en la presencia o ausencia de membrana lipídica en la estructura viral nativa, las VLPs se clasifican en dos grandes grupos, VLPs envueltas o VLPs no envueltas, respectivamente. Por otro lado, según cómo se organizan las proteínas estructurales pueden ser simple, doble o triple capa, y pueden contener una o varias proteínas estructurales (**Fig. 3**)^{54, 55}.

Las VLPs envueltas obtienen su membrana lipídica mediante evaginación de la célula hospedadora en donde fueron sintetizadas⁴¹. La naturaleza y composición de la bicapa lipídica es diferente para cada tipo de VLP envuelta; y ésta depende, por supuesto, del virus nativo del cual procede la VLP y del tipo celular que se utiliza para su producción. Estas consideraciones se deben tener en cuenta a la hora de elegir el microorganismo para producir estas nanopartículas³³. Para el desarrollo de vacunas, se pueden insertar glicoproteínas en la membrana lipídica, las cuales suelen ser los antígenos diana detectados por el sistema inmunitario para la producción de anticuerpos. Las VLPs del virus Influenza son un ejemplo de esto, donde se insertaron en la membrana lipídica la proteína M1 de la matriz, hemaglutinina y/o neuraminidasa⁵⁶.

Por otro lado, las VLPs no envueltas están típicamente formadas por una o más proteínas estructurales de un patógeno que se autoensamblan, de manera que no incluyen ningún compuesto de la célula productora⁵⁷. Presentan una ventaja con respecto a las VLPs envueltas debido a que su estructura es menos compleja, por lo que suelen ser más fáciles de producir³³. Las VLPs no envueltas más sencillas que están conformadas por una única proteína estructural, como la derivada del HPV, se sintetizan tanto en sistemas eucariotas⁵⁸ como procariotas⁵⁹. En otros casos, se sintetiza de manera recombinante la proteína de la cápside y luego se ensambla la estructura en un ambiente libre de células, para fomentar un homogéneo ensamblado de las nanoestructuras⁶⁰. Las VLPs no envueltas que tienen múltiples capas son más complejas por lo que habitualmente se sintetizan en eucariotas superiores como plantas⁶¹, levaduras⁶² o células de insectos⁶³. Estos sistemas de producción permiten la co-expresión de diferentes proteínas al mismo tiempo, y por lo tanto, el ensamblado de nanoestructuras complejas en la misma célula.

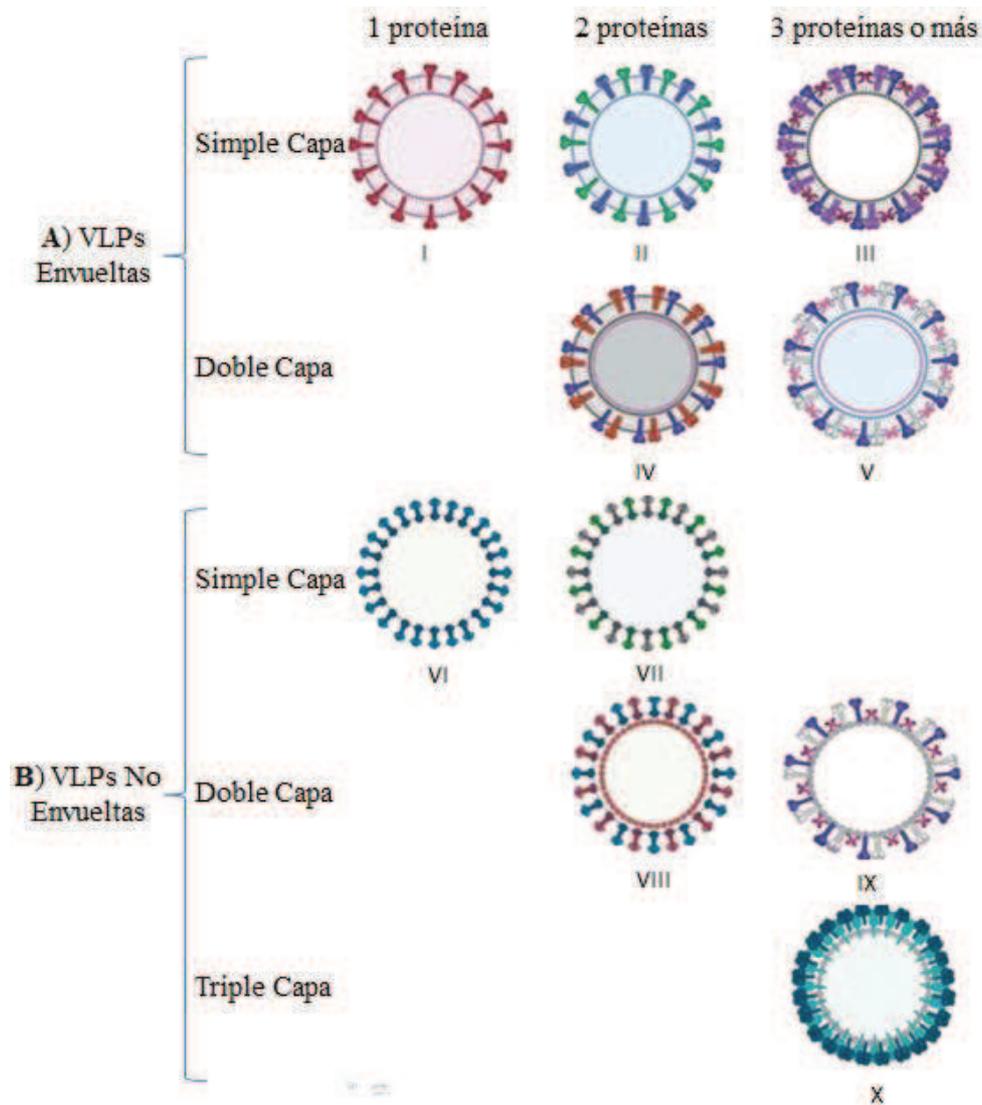


Figura 3: Clasificación y ejemplos de VLPs. Se muestra la clasificación utilizada para las VLPs, y a continuación algunos ejemplos: I) VLPs del ectodominio de la proteína de matriz del virus de la influenza⁶⁴. II) VLPs del Hantavirus⁶⁵. IV) VLPs del virus de la Hepatitis C⁶⁶. V) VLPs del virus del Síndrome respiratorio agudo grave (SARS)⁶⁷. VI) VLPs del virus de la Hepatitis B (simple capa compuesto por una única proteína (Figura XB i-))⁶⁸. VII) VLPs del virus del mosaico del caupí⁶⁹. VIII) VLPs de las proteínas L1 y L2 del HPV⁷⁰. IX) VLPs del virus de la fiebre aftosa⁷¹. X) VLPs del rotavirus⁷². Adaptado de Nooari y colaboradores³³.

Entre las numerosas VLPs desarrolladas, una de las utilizadas es la del bacteriófago MS2 (VLPs-MS2). Este virus de estructura simple (no envuelto, simple capa y compuesto por una única proteína) tiene un gran potencial terapéutico. Entre otras aplicaciones, las VLPs-MS2 pueden ser utilizadas como nanotransportadores para encapsular diferentes cargos y, mediante modificación externa de la cápside, ser dirigidas hacia tejidos específicos⁷³.

VLPs-MS2

El bacteriófago MS2 posee una cápside icosaédrica de 27 nm de diámetro, conformada por 180 copias de la proteína de la cápside (CP) que se autoensamblan⁷⁴ (**Fig. 4**). Las VLPs derivadas de este virus tienen un diámetro interno de 22 nm, por lo que son ampliamente utilizadas como vector para transportar drogas, proteínas, epítopes peptídicos y moléculas de ADN o ARN^{73,75-77}. Para las estrategias de terapia dirigida, se suele modificar química o genéticamente la superficie exterior de estas nanopartículas con ligandos específicos de tejidos celulares diana^{78,79}. Incluso, estas nanopartículas se utilizan para el desarrollo de vacunas ya que inducen tanto la respuesta humoral como celular⁸⁰⁻⁸².

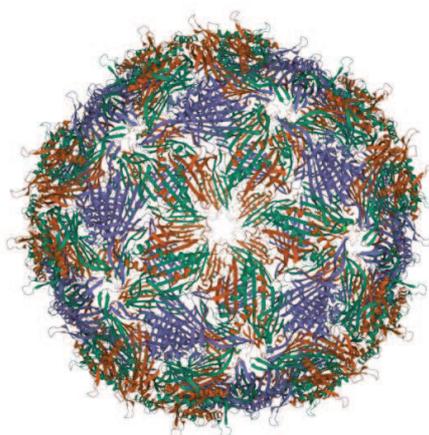


Figura 4: Estructura tridimensional de VLP-MS2. Representación de una VLP derivada del bacteriófago MS2. Para el ensamblado, la proteína CP forma dímeros asimétricos (rojo/verde) o simétricos (violeta/violeta), el diámetro externo es de 27 nm y el interno de 22 nm⁷⁷.

La estructura cristalográfica del bacteriófago fue resuelta con una resolución de 2.8 Å, el MS2 tiene una cápside icosaédrica con número de triangulación $T = 3^{74}$ (este número indica la cantidad de unidades estructurales por cara del icosaedro)⁸³. El genoma es ARN monocatenario positivo de 3569 bases y codifica para cuatro proteínas (**Fig. 5**)⁸⁴.

Como se mencionó anteriormente, la cápside del bacteriófago está formada por 180 copias de CP, una proteína de 130 aminoácidos. Para conformar la cápside, la proteína CP se dimeriza e interacciona con un fragmento del genoma viral de 19 nucleótidos que forma una horquilla (región TR) (**Fig. 5**). Esta región se encuentra en el extremo 5' del gen de la replicasa, de hecho contiene la región Shine-Dalgarno y el codón de iniciación del gen mencionado⁸⁵.

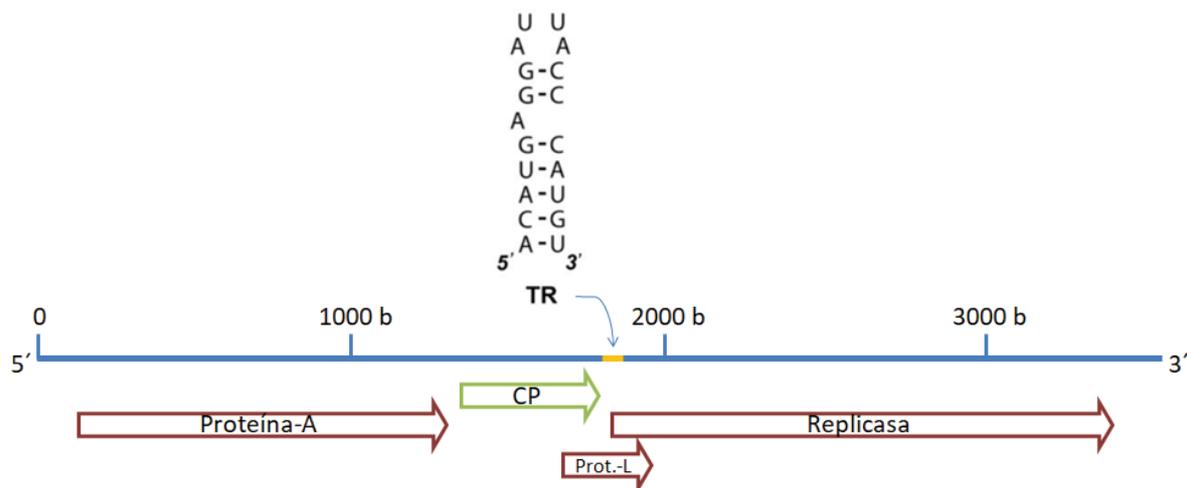


Figura 5: Genoma del bacteriófago MS2. Representación visual del genoma viral de 3569 bases (b), el cual codifica para cuatro proteínas: la proteína de la cápside (CP), la proteína de maduración (Proteína-A), la replicasa y la proteína de lisis (Prot.-L). En amarillo se marca la región TR, la cual interactúa con el dímero de CP⁸⁶.

La interacción entre el ARN viral y la proteína CP genera un complejo de iniciación, el cual nuclea más dímeros de CP y genera que el ARN colapse y se vaya ensamblando la cápside alrededor del mismo⁸⁶. Se generan dos tipos de dímeros, en mayor proporción uno asimétrico (A/B) y en menor proporción uno simétrico (C/C)⁸⁷. La diferencia entre las tres cuasi equivalentes estructuras de la proteína está en la conformación del FG loop⁸⁸. Entonces, 60 dímeros asimétricos más 30 dímeros simétricos forman la cápside icosaédrica (**Fig. 6**)⁷⁴. El genoma viral tiene una función estructural en el ensamblado de las VLPs, debido a que es encapsulado cuando la región TR interactúa con CP⁸⁹. De todas maneras, la proteína viral es el componente clave del proceso de ensamblado, ya que la cápside puede autoensamblarse a partir de la proteína CP sin necesidad de una molécula de ARN⁵⁷.

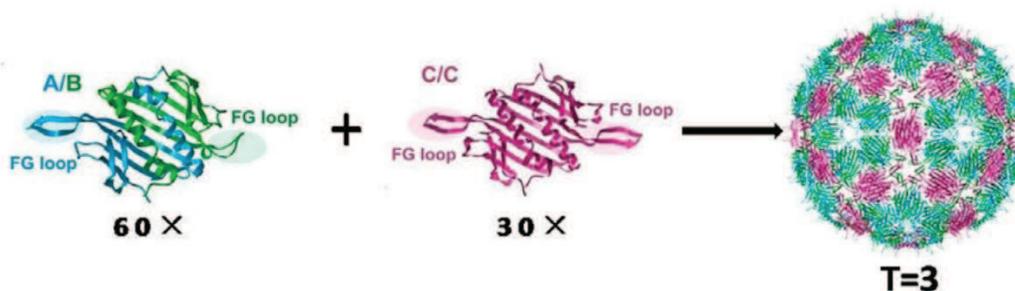


Figura 6: Ensamblado de VLP-MS2. La cápside icosaédrica de triangulación T=3 se autoensambla a partir de 60 dímeros de CP asimétricos (A/B) y 30 simétricos (C/C), sin necesidad del ARN viral⁷³.

Considerando que para el ensamblado de la cápside la proteína estructural forma un dímero, Peabody y Lim⁹⁰ fusionaron 2 copias del gen que codifica para la proteína CP para optimizar la producción de VLPs. Mediante ingeniería genética eliminaron el codón de terminación (codón de *stop*) de la primera copia y la unieron con una secuencia

puente de 2 aminoácidos a la segunda copia. Mediante microscopía electrónica los autores observaron que estas estructuras son indistinguibles de las generadas por la proteína CP expresada en forma de monómero. Por otro lado, un estudio reciente demostró que la proteína CP es un dímero “obligado” debido a su estabilidad cinética, la proteína monomérica se debe dimerizar para terminar de plegarse y llegar a su menor estado de energía⁹¹. Generalmente, la estrategia utilizada para producir estas VLPs es mediante expresión heteróloga de dímeros de CP en bacterias o levaduras, y las VLPs se ensamblan dentro de la misma célula hospedadora^{92,93}.

La estabilidad del bacteriófago MS2 es afectada por diferentes factores fisicoquímicos, como la temperatura⁹⁴, la fuerza iónica⁹⁵ o el pH⁹⁶. Particularmente, la sensibilidad de la cápside a cambios en el pH es aprovechada para la encapsulación de diferentes cargas. Cuando el virus se encuentra a un pH menor a 4.5, se desestabiliza y desarma, proceso que se revierte cuando se sube el pH a 7⁹⁶. Como se mencionó anteriormente, la cápside se puede auto ensamblar con la región TR que interacciona directamente con la proteína CP. Una estrategia en la cual se aprovechan estas características consiste en conjugar moléculas (ADN/ARN, drogas o proteínas) a la región TR y, mediante la disminución del pH a 4.5 y posterior aumento a 7, las moléculas pueden ser empaquetadas dentro de la cápside⁹⁷. De esta manera se aprovecha el volumen interior de la cápside (22-23 nm de diámetro aproximadamente).

El campo de aplicación de estas VLPs crece de forma exponencial. Debido a todas las características mencionadas anteriormente, las VLPs-MS2 se utilizan para desarrollar vacunas contra, por ejemplo, el HPV, entre otras⁹⁸⁻¹⁰⁰. Por otro lado, hay un abordaje que utiliza VLPs-MS2 para rastrear moléculas de ARN en células vivas¹⁰¹ y también se han desarrollado estrategias para la identificación de epítopes peptídicos utilizando estas VLPs^{102,103}.

También están siendo utilizadas como plataforma de entrega de cargos terapéuticos debido a sus características. Como se mencionó anteriormente, se puede modificar química o genéticamente su superficie para abordajes de terapia dirigida o para desarrollo de vacunas. También, son fáciles de producir mediante tecnología recombinante en bacterias o levaduras. Y por último, es provechosa la estrategia utilizada para encapsular cargas que involucran la interacción de la región TR con la superficie interna de la cápside.

Son muchos los tipos de aplicaciones que tienen estas VLPs como plataforma de entrega (**Fig. 7**). Las vacunas basadas en ARN mensajero (ARNm) están emergiendo como alternativa a las vacunas tradicionales, pero su principal problema es la inestabilidad del ARNm frente a las RNAsas¹⁰⁴. Existen numerosos abordajes para encapsular los ARNm y contrarrestar la limitación mencionada. Se han desarrollado VLPs-MS2 que encapsulan ARNm para tratamientos de diferentes enfermedades como el cáncer de próstata (**Fig. 7-A**)^{81,105}. Para el desarrollo de vacunas, también se han diseñado VLPs-

MS2 que presentan en su superficie epítopes peptídicos para ser reconocidos por el sistema inmune. Generalmente esto se hace mediante la inserción de una secuencia de ADN codificante en fase a la proteína CP. Un ejemplo de esto es la que se ha desarrollado contra HPV que tiene un efecto similar, en ratones, a la vacuna de última generación Gardasil-9¹⁰⁶. Los autores expresaron diferentes péptidos de la proteína menor de la cápside (L2), los cuales son expuestos en la superficie cuando se ensambla la cápside de la VLP (**Fig. 7-B**).

Las VLPs basadas en el bacteriófago MS2 también son utilizadas para transportar otros cargos. Ya han sido desarrolladas algunas conteniendo drogas quimioterapéuticas, ARNs de interferencia pequeños (siARN) y toxinas que se dirigen específicamente hacia células de hepatocarcinoma (**Fig. 7-C, D**)⁷⁵. También, se desarrollaron VLPs-MS2 para transportar microARNs (miARN) a células mononucleares de sangre periférica y así inhibir la osteoclasto génesis (**Fig. 7-C**)¹⁰⁷.

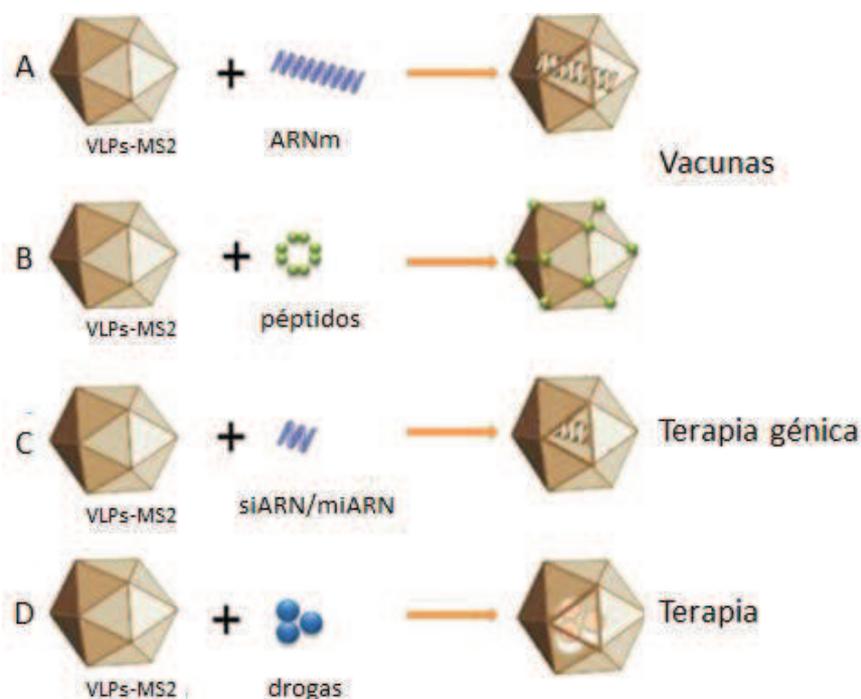


Figura 7: Abordajes utilizando VLPs-MS2. Se ejemplifican desarrollos para tratamiento terapéuticos utilizando como plataforma VLPs-MS2.

Como se mencionó, las VLPs-MS2 se producen mediante expresión heteróloga de dímeros de CP en bacterias o levaduras, y las cápsides se autoensamblan dentro del mismo microorganismo. Para evaluar si se podría utilizar esta plataforma en terapias dirigidas para tratamiento de cáncer de pulmón se necesitan hacer numerosos ensayos. Considerando que en los procesos de purificación se suele perder masa de proteína recombinante¹⁰⁸, y para optimizar al máximo el proceso de obtención de las VLPs, es crítico que el rendimiento de producción de proteína recombinante del microorganismo sea alto. Hay numerosas maneras de optimizar la producción de una proteína

heteróloga, tanto a nivel del microorganismo productor, como a nivel de los medios de cultivo utilizados o en los diseños de los vectores de expresión. A continuación, se detalla una estrategia para optimizar el vector de expresión de una proteína recombinante en un sistema de expresión heteróloga utilizando la serie de vector pET en bacterias *Escherichia coli* BL21(DE3).

Optimización de la expresión proteica

En relación a la optimización de la producción de una proteína recombinante en un vector de expresión pET es interesante destacar el trabajo realizado por Shilling y colaboradores¹⁰⁹. Los autores reportaron defectos en el diseño del plásmido pET28a y, para subsanarlo, desarrollaron vectores mejorados que rectifican estas deficiencias y demostraron que aumentan considerablemente la producción de proteínas recombinantes diferentes. Estas mejoras pueden ser implementadas en la mayoría de los vectores pET (Agilent Technologies, Inc. Santa Clara, CA).

En primer lugar, los autores encontraron que el promotor T7 del plásmido pET28a es una variante truncada de la secuencia consenso completa del promotor T7, son 4 bases las que faltan (**Fig. 8**). El supuesto fue verificado observando que se triplica la producción de GFP en *E. coli* cepa BL21(DE3) pLysS cuando se adicionan las 4 bases al promotor. Lo probaron en otras 2 cepas diferentes, C41(DE3) y C43(DE3), y encontraron resultados semejantes. También lo evaluaron con el vector pET15b, que contiene la misma región T7lac y obtuvieron efectos parecidos.

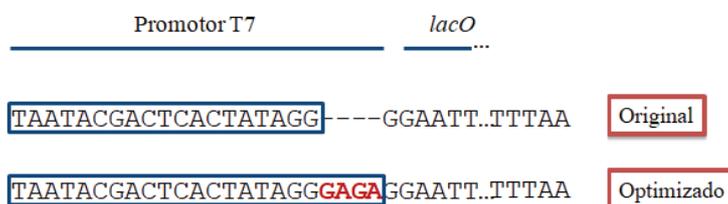


Figura 8: Defecto de diseño en el promotor T7. Al promotor T7 original le faltan 4 bases, las cuales se muestran marcadas en rojo en el vector optimizado.

En segundo lugar, los autores encontraron un defecto en el diseño de la secuencia en la Región de Inicio de la Traducción (TIR). Dicha región, de 30 nucleótidos aproximadamente, es reconocida por la subunidad 30S del ribosoma en el inicio de la traducción. Está compuesta por la secuencia Shine-Dalgarno, un espacio de entre 5 y 9 nucleótidos y los primeros 5 codones de la secuencia codificante. A partir de investigación bibliográfica, los autores suponen que la región TIR del pET28a fue ensamblada por fusión *ad hoc* de módulos genéticos, en lugar de haber sido considerada la coevolución de los ARNm con los ribosomas de *E. coli*.

Por lo tanto, los autores plantearon un experimento de evolución sintética con el fin de identificar una región TIR que presumiblemente sea más compatible con los ribosomas de la célula huésped. Brevemente, mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR) utilizando cebadores degenerados, confeccionaron una biblioteca de más de 16 millones de vectores con regiones TIR alternativas, luego transformaron bacterias y evaluaron el nivel de expresión de un gen de resistencia sometiénolas a altos niveles de antibiótico. Los autores encontraron una variante que aumentaba 47 veces la producción de GFP, y la llamaron TIR2 (**Fig. 9**).

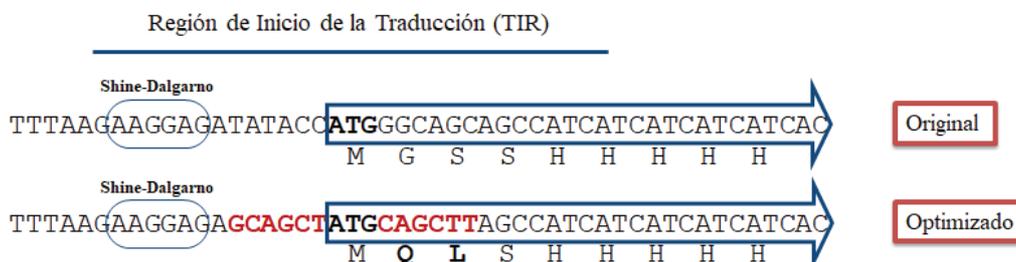


Figura 9: La evolución sintética generó una región TIR optimizada. Los experimentos llevados a cabo por los autores generaron una variante TIR alternativa (TIR2) que aumentó la producción de GFP. En rojo se resaltan las bases diferenciales.

Es importante remarcar que en esta estrategia necesariamente cambian los primeros 2 aminoácidos de la proteína recombinante analizada. De todas maneras los autores aclaran que, en su caso, la estabilidad de la proteína se mantiene.

Finalmente, los autores crearon una versión mejorada del plásmido de expresión pET28a combinando la región T7 consenso con la región TIR2 (**Fig. 10**). Cuando se combinaron, observaron que la producción de GFP aumentaba 121 veces en comparación con la versión estándar. También, lo evaluaron con 2 proteínas recombinantes más y observaron resultados semejantes. En un experimento final, los autores observaron que la solubilidad de las proteínas recombinantes se mantuvo a pesar de los altos rendimientos.



Figura 10: Combinación del promotor T7 consenso y la región TIR2. Los autores diseñaron un plásmido incorporando las regiones mencionadas (en rojo las bases diferenciales) y observaron un aumento en la producción de las 3 proteínas recombinantes donde lo probaron.

El laboratorio en el cual se desarrollará este trabajo cuenta con un plásmido de expresión de dímeros de CP (dCP) unidos mediante un puente aminoacídico (**pET21-dCP**). Esta estructura plasmídica permite producir la proteína recombinante en bacterias sin contener el ARN viral y, de esta forma, generar VLPs-MS2. Para mejorar los niveles de producción de VLPs-MS2, se buscará optimizar el vector de expresión

incorporando mediante una estrategia de clonado las regiones mencionadas (promotor T7 consenso y TIR2).

También, en paralelo, se buscará eliminar del pET21-dCP una etiqueta o *tag* que está fusionado en el extremo N-terminal de dCP, el T7 leader. Esta secuencia codificante fue incorporada en el plásmido cuando se sintetizó químicamente, con el objetivo de optimizar la expresión¹¹⁰. Pero al observar en experimentos preliminares bajos niveles de producción, en este trabajo se llevó a cabo una estrategia para eliminarlo.

Considerando que la temperatura es un factor crítico cuando se considera la expresión de una proteína recombinante en un sistema de expresión heteróloga, se evaluarán diferentes temperaturas de crecimiento para la producción de VLPs-MS2¹¹¹.

Con el objetivo de analizar el uso de las VLPs-MS2 como nanotransportadores de cargos terapéuticos para tratamientos de cáncer de pulmón, como prueba de concepto, se encapsulará una molécula reportera. Un marcador fluorescente usualmente utilizado en nanotecnología son los Quantum Dots (QDs).

Quantum Dots

Los QDs o puntos cuánticos son ampliamente utilizados como marcadores fluorescentes en análisis biológicos, incluyendo ensayos inmunológicos. Son nanocristales de semiconductores que miden entre 1 y 10 nm, compuestos por elementos de la tabla periódica de los grupos II-VI o III-V. Estos emiten fluorescencia, dependiendo de su tamaño y composición, desde el ultravioleta hasta el infrarrojo. Una de sus ventajas es que, debido a sus características, permiten ser excitados sin sufrir foto desgaste, como ocurre con los fluoróforos orgánicos (**Fig. 11**)^{112,113}.

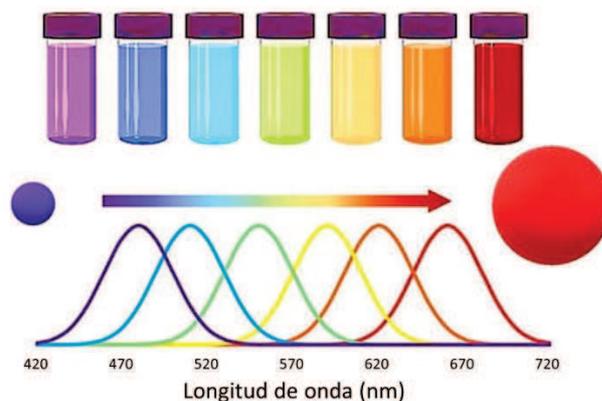


Figura 11: Emisión de Quantum Dots. A mayor tamaño, mayor longitud de onda, menor la frecuencia de emisión. Adaptado de Kargozar, S. y colaboradores¹¹².

En síntesis, la optimización de la producción de VLPs-MS2 y la evaluación de su capacidad de carga permitirán el desarrollo de un vector para el transporte de biofármacos o drogas quimioterapéuticas, para el tratamiento de cáncer de pulmón y otras enfermedades.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general del proyecto en el que se encuadra esta tesis es el desarrollo de Partículas Similares a Virus o *Virus Like Particles* (VLPs) del bacteriófago MS2. Estas nanoestructuras permitirán el transporte de proteínas recombinantes y/o drogas quimioterapéuticas para eliminar o disminuir el crecimiento de células de cáncer de pulmón, disminuyendo los efectos colaterales.

En particular, esta tesis tiene como objetivos:

- 1. Optimizar la expresión y el proceso de purificación de las VLPs del bacteriófago MS2.**
 - 1.1. Se eliminará el tag del T7 leader que se encuentra en el extremo N-terminal de la proteína recombinante dCP.
 - 1.2. Mediante una estrategia de clonado se incorporarán las regiones mencionadas anteriormente, promotor T7 consenso y TIR2, en el plásmido de expresión.
 - 1.3. Considerando que la temperatura de crecimiento bacteriano es crítica en la producción de proteínas recombinantes, se estudiará cómo afecta este factor en el rendimiento de producción de VLPs.
 - 1.4. Se estudiarán distintos procesos de purificación de VLPs-MS2 mediante técnicas de cromatografía y/o filtración.
- 2. Ensamblar VLPs-MS2 conteniendo una proteína reportera en su interior unida mediante un ADN quimera.**
 - 2.1. Para validar la hipótesis de que las VLPs-MS2 podrán transferir proteínas recombinantes o drogas quimioterapéuticas, se encapsularán, como prueba de concepto, Quantum Dots.

MATERIALES Y MÉTODOS

El laboratorio ya ha sintetizado químicamente (GenScript USA Inc., Piscataway, NJ) la secuencia de dímeros de CP (dCP), que fueron clonadas en un plásmido de expresión (**pET21-dCP**) para la obtención de VLPs-MS2 en bacterias. Cada subunidad tiene 130 aminoácidos y están unidas por un puente aminoacídico (glicina y alanina), por lo que el dímero generado tiene 262 aminoácidos y un peso molecular calculado de 27,8 kDa (ver anexo). El plásmido fue sintetizado con la secuencia del T7 leader en el extremo N-terminal de la proteína dCP. Debido a que se observaron bajos niveles de producción, se desarrolló una estrategia para eliminar la secuencia codificante del T7 leader, obteniendo el plásmido **pET21-dCP0** (**Fig. 12**).

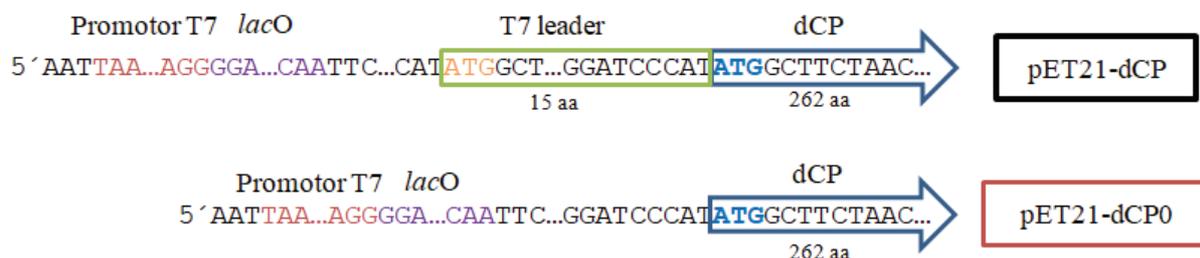


Figura 12: Esquema de plásmidos de expresión de dCP. Arriba, el plásmido sintetizado químicamente donde se incluyó el tag del T7 leader (pET21-dCP) y abajo, el plásmido a obtener donde se elimina la secuencia del T7 leader (pET21-dCP.0). Se observa el operador lac (*lacO*), el dímero de CP (dCP) y la cantidad de aminoácidos (aa) de las secuencias codificantes.

Obtención del plásmido pET21-dCP0

La estrategia para la obtención del plásmido pET21-dCP0 fue la siguiente: se llevó a cabo un corte con la enzima de restricción *NdeI* del plásmido pET21-dCP, y un posterior religado para eliminar la secuencia codificante del T7 leader (**Fig. 13**).

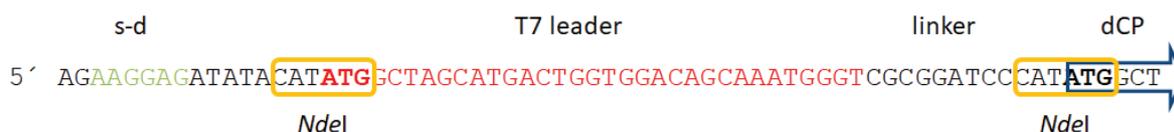


Figura 13: Secuencia del plásmido pET21-dCP. Se detalla la secuencia nucleotídica del T7 leader en el extremo N-terminal de dCP. Se marca la región Shine-Dalgarno (s-d), se marca la región codificante del T7 leader en rojo (11 aa), un linker (4 aa) y con una flecha azul se recuadra el inicio de la secuencia codificante del dímero de CP (dCP), y en amarillo se recuadra la secuencia de reconocimiento de la enzima de restricción *NdeI*.

Cultivo de bacterias conteniendo el plásmido pET21-dCP

Se inoculó una colonia de *E. coli* cepa DH5- α conteniendo el plásmido pET21-dCP en 5 ml de Luria-Bertani (LB) con Ampicilina 50 μ g/ml. Se dejó crecer toda la noche a 37 $^{\circ}$ C con agitación orbital a 200 rpm para luego purificar el plásmido.

Para la elaboración del medio LB se mezclaron los componentes (**Tabla 1**) mediante agitación y se llevó al volumen deseado con agua bidestilada. Luego se autoclavó 20 minutos (min) a 121 °C y 103 kPa.

NaCl (SigmaAldrich. Saint Louis, MO)	10 g/L
Triptona (Oxoid. Basingstoke, Inglaterra)	5 g/L
Extracto de Levadura (Oxoid. Basingstoke, Inglaterra)	10 g/L
NaOH (Cicarelli. San Lorenzo, Argentina) hasta pH 7	~1 mM

Tabla 1: Composición del medio Luria-Bertani (LB).

Minipreparación

Para llevar adelante la purificación del plásmido se prepararon las siguientes soluciones:

- ✓ P1 - Buffer de resuspensión
 - 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)
 - 10 mM EDTA
 - Se conservó a temperatura ambiente
- ✓ P2 - Solución de desnaturalización
 - 0,2 N NaOH
 - 1% dodecilsulfato sódico (SDS)
 - Se conservó a temperatura ambiente
- ✓ P3 - Solución de renaturalización
 - 3M acetato de potasio (pH 5.2)
 - 2M ácido acético glacial
 - Se conservó a 4°C

El protocolo utilizado se detalla a continuación:

1. Partir de 1 eppendorf conteniendo 1,5 ml de cultivo bacteriano.
2. Centrifugar a máxima velocidad por 20 segundos en centrífuga de mesada.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 100 µl de P1 y agregar 2 µl de Ribonucleasa A (ARNasa) 10 mg/ml (Sigma Aldrich).
5. Dejar actuar 2-3 minutos.
6. Agregar 200 µl de P2 y mezclar invirtiendo cabeza-cola 4-5 veces.

7. Esperar a que el líquido se vuelva transparente (como máximo 5 minutos) e incubar en hielo por 5 minutos. (En caso de que no esté transparente, agregar 50-100 µl de P2 y 25-50 µl de P1.)
8. Agregar 150 µl de P3. (En caso de aumentar el volumen de P2, mantener proporción de 1/3 de P3 en el volumen final)
9. Mezclar invirtiendo cabeza-cola 4-5 veces.
10. Incubar en hielo 10-15 minutos.
11. Centrifugar a máxima velocidad (al menos 13.000 g) por 15 minutos.
12. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo.
13. Agregar 1 ml de etanol 100% (2 volúmenes) o 350 µl de isopropanol (0.7 volúmenes) para precipitar el ADN. Invertir cabeza-cola 4-5 veces para mezclar.
14. Incubar a -20 °C durante 20 minutos.
15. Centrifugar a máxima velocidad 15 minutos.
16. Descartar el sobrenadante.
17. Agregar 500 µl de etanol 70% por la pared y rotar el tubo para hacer correr el etanol por las paredes.
18. Centrifugar a máxima velocidad 5 minutos.
19. Repetir pasos 17-18.
20. Descartar el sobrenadante y dejar el tubo abierto por 10-15 minutos.
21. Resuspender el pellet en 25-50 µl de agua bidestilada.

Luego de la purificación del ADN plasmídico, se cuantificó la masa mediante espectrofotómetro de microvolúmenes (Nanodrop ND1000. Thermo Fisher Scientific. Waltham, MA). Por otro lado, para visualizar la integridad y la pureza, se sembró en un gel de agarosa 1.2% teñido con Bromuro de Etidio [0,05 mg/ml] y la corrida electroforética fue llevada a cabo en una cuba de electroforesis Mini-Sub Cell GT (Bio-Rad Lab. Hercules, CA) utilizando buffer TAE 1X (**Tabla 2**) para luego ser visualizados en el documentador de geles ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare. Chicago, IL).

Tris-base	0.04 M
Ácido acético glacial	0.02 M
Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) pH 8,0	1 mM

Tabla 2: Composición buffer TAE 1X

Corte de ADN mediante la enzima de restricción *NdeI*

Con el plásmido pET21-dCP purificado se llevó a cabo la restricción con la enzima *NdeI*. Se incubó 1 µl de *NdeI* (Cat. R0111S, New England BioLabs [NEB], Ipswich,

MA), 2 μ l de buffer Cutsmart (10X) y 17 μ l de agua bidestilada conteniendo el plásmido purificado. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Luego de la restricción, se desfosforiló el vector con la enzima Fosfatasa Alcalina rSAP (recombinant Shrimp Alkaline Phosphatase #M0371. NEB) para evitar el religado. Se agregó al tubo de restricción, 1 μ l de rSAP y se incubó 30 minutos a 37 °C, luego se inactivó la enzima mediante la incubación a 65 °C durante 5 minutos.

Purificación del ADN

El plásmido pET21-dCP cortado con *NdeI* según las condiciones mencionadas anteriormente se sembró en un gel de agarosa 1.2%. Se cortó con un bisturí estéril la banda del vector identificada con el transiluminador DyNA Light Dual Intensity UV (Labnet International. Edison, NJ) y se utilizó el kit AccuPrep® PCR/Gel Purification Kit (Bioneer. Daejeon, Corea del Sur) para purificar la molécula de ADN.

Re-Ligación del plásmido

La re-ligación fue llevada a cabo utilizando el kit pGEM-T Easy (Promega Corp. Madison, WI). Se mezcló 5 μ l de Rapid Ligation Buffer 2X, 1 μ l de T4 ADN ligasa, 1-4 μ l del plásmido (100 ng) y agua bidestilada para llevar a volumen final de 10 μ l. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y luego se dejó toda la noche a 4 °C. Se realizó un control sin ligasa para evaluar la posibilidad de purificar accidentalmente vector circular junto al fragmento de restricción. Luego se hizo una transformación de la ligación en bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5- α .

Preparación bacterias *E. coli* cepa DH5- α competentes

Previo a la transformación se prepararon bacterias competentes, para esto se llevó a cabo el siguiente protocolo.

1. En condiciones de esterilidad, tomar con un ansa las bacterias conservadas en glicerol 10% a -80 °C.
2. Rastrillar en zig-zag en una placa de petri con LB - Agar (**Tabla 3**) y antibiótico correspondiente a la cepa (ácido nalidíxico 25 μ g/ml)
3. Incubar toda la noche a 37 °C.
4. Picar 1 colonia y crecer en 5 ml de LB a 37 °C y agitación orbital a 200 rpm ON.
5. Realizar una dilución 1/100 en 100 ml de Terrific Broth (TB) (**Tabla 4**), incubar a 37 °C y agitación orbital a 200 rpm.
6. Cuando el medio llega a una Densidad Óptica a 600 nm (OD_{600nm}) de 0,4-0,5, poner en hielo por 20 minutos.
7. Poner en hielo $CaCl_2$ 0.1M para su uso posterior.
8. Centrifugar 15 minutos (1.200g a 4 °C) y resuspender en 12,5 ml de $CaCl_2$ 0,1M e incubar 20 minutos en hielo.

9. Volver a centrifugar 15 minutos (1200g a 4 °C) y resuspender en 3,5 ml de CaCl₂ 0,1M con glicerol 15%.
10. Alicuotar en tubos eppendorf fríos de a 100 µl y congelar rápidamente en nitrógeno líquido.
11. Conservar a -80 °C.

NaCl (SigmaAldrich. Saint Louis, MO)	10 g/L
Triptona (Oxoid. Basingstoke, Inglaterra)	5 g/L
Extracto de Levadura (Oxoid. Basingstoke, Inglaterra)	10 g/L
NaOH (Cicarelli. San Lorenzo, Argentina) para pH 7,0	~1 mM
Agar (Difco. Detroit, MI)	15 g/L

Tabla 3: Composición del medio LB - Agar.

Mezclar los componentes mediante agitación y llevar al volumen deseado con agua bidestilada. Luego autoclavar 20 minutos. Antes de que se gelifique, volcar 15-20 ml por placa de Petri con el antibiótico indicado.

Extracto de Levadura (Oxoid. Basingstoke, Inglaterra)	24 g/l
Triptona (Oxoid. Basingstoke, Inglaterra)	20 g/l
Glicerol (Cicarelli. San Lorenzo, Santa Fe)	4 ml/l
Buffer Fosfato (Cicarelli. San Lorenzo, Santa Fe)	0.17 M KH ₂ PO ₄
Buffer Fosfato (Sigma Aldrich. Saint Louis, MO)	0.72 M K ₂ HPO ₄

Tabla 4: Composición del medio Terrific Broth (TB).

Mezclar los componentes (excepto el Buffer Fosfato) mediante agitación y al volumen deseado con agua bidestilada. Luego autoclavar 20 minutos. Agregar el Buffer Fosfato autoclavado al momento de largar el cultivo.

Transformación de bacterias *E. coli* cepa DH5-α

Se incubaron 50 µl de bacterias *E. coli* cepa DH5-α competentes con 5 µl de la religación durante 30 minutos en hielo. Luego las células se sometieron a un shock térmico de 42 °C durante 45 segundos, posteriormente se dejó reposar 2 minutos más en hielo. Luego se agregó 1 ml de medio de crecimiento LB, y se las puso a recuperar 1 hora a 37 °C y agitación orbital a 200 rpm. Luego se centrifugó durante 20 segundos a máxima velocidad y se resuspendió el pellet en 100-150 µl del LB remanente. Se plaqueó en placas de medio LB-Agar con Ampicilina 50 µg/ml y se crecieron toda la noche a 37 °C.

PCR de colonias

Se llevó a cabo una PCR de colonias bacterianas con cebadores específicos para detectar clones positivos. El tamaño del amplicón esperado es de 160 pb, mientras que para el vector sin modificaciones es de 205 pb. Para la PCR de colonias se utilizó un volumen final de 25 μ l, donde las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de $MgCl_2$, 1X PCR Buffer, cebadores 0,5 μ M, Taq ADN polimerasa (ThermoFisher Scientific) 0,025 U/ μ l y 1 colonia a evaluar. Se procesaron 8-10 bacterias.

Los cebadores utilizados fueron sintetizados químicamente (Genbiotech SA., CABA) y se detallan a continuación:

Cebador 1: 5´ -CGAGATCTCGATCCCGCGAA-3´

Cebador 2: 5´ -CCGGTACCGCCATTGTCGACGAGAACGAACTGAGTAAAGTTAGAAGC-3´

Se utilizó el termociclador T-18 (Ivema Desarrollos. Lanús, Bs As.) y las condiciones de ciclado fueron las siguientes (**Tabla 5**):

Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	1 ciclo
Desnaturalización	94 °C	30 seg	35 ciclos
Hibridación	49 °C	30 seg	
Elongación	72 °C	30 seg	
Elongación final	72 °C	1 min	1 ciclo

Tabla 5: Ciclo utilizado para la PCR de colonias.

Para evaluar los resultados, los tubos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa 3% teñidos con Bromuro de Etidio [0,05 mg/ml] y la corrida electroforética fue llevada a cabo como se mencionó anteriormente. Los geles se analizaron mediante el documentador de geles ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare. Chicago, IL).

Obtención de plásmidos pET21-dCP2 y pET21-dCP1

Basados en los datos obtenidos por los autores mencionados¹⁰⁹, se desarrolló una estrategia de clonado mediante enzimas de restricción para poder incorporar las dos modificaciones, promotor T7 consenso y región TIR2, en el plásmido de expresión pET21-dCP, obteniendo el plásmido **pET21-dCP2 (Fig. 14)**.

Considerando que por la estrategia planteada para generar el pET21-dCP2, se están agregando 2 aminoácidos extras después de la metionina inicial a la proteína dCP, glutamina y leucina, en paralelo se llevó a cabo una estrategia de clonado incluyendo únicamente las 6 bases río arriba del ATG (región TIR2 parcial), obteniendo el plásmido

pET21-dCP1 (Fig. 14). De esta manera se obtiene la proteína recombinante sin los 2 aminoácidos adicionales, pero el plásmido tendrá el promotor T7 consenso y una región parcial del TIR2, por lo que se espera que la producción sea mayor con respecto al original.

Vale la pena destacar que, al igual que para el caso del **pET21-dCP0**, se buscó retirar la secuencia del T7 leader en ambos plásmidos. En la sección anterior se detalló la estrategia para la obtención del pET21-dCP0, y a continuación se detalla la estrategia para la obtención de los plásmidos pET21-dCP2 y pET21-dCP1.

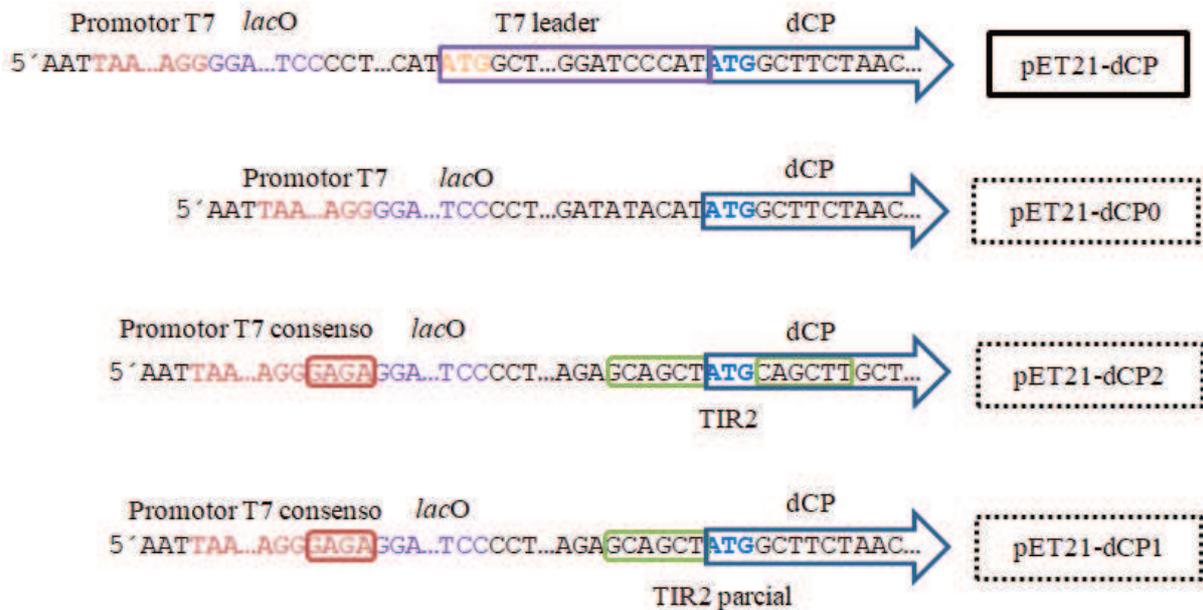


Figura 14: Esquema de plásmidos de expresión de dCP. Se muestra la secuencia del plásmido original con el que contaba el laboratorio (pET21-dCP), y los plásmidos a obtener durante este trabajo. El recuadro violeta contiene la secuencia T7 leader y el recuadro rojo las 4 bases agregadas al promotor T7. En el caso de los recuadros verdes señalan las bases alternativas de la región TIR.

Cultivo de bacterias conteniendo el plásmido pET28-mSA y Minipreparación

El laboratorio contaba con un plásmido de expresión de estreptavidina monomérica (mSA) que fue sintetizado químicamente (GenScript USA Inc., Piscataway, NJ) en el cual se incluyeron las regiones de interés (pET28-mSA) (**Fig. 15**).



Figura 15: Esquema del pET28-mSA. Este plásmido de expresión incluye las regiones de interés, T7 consenso y TIR2. Se muestra el promotor (flecha), el operón lac (lac), la región Shine-Dalgarno (sd), el gen (mSA), el terminador (T), la región T7 consenso (T7 cons.) y la región TIR2 (TIR2).

Se inoculó una colonia de *E. coli* cepa DH5- α conteniendo el plásmido pET28-mSA en 5 ml de LB con Ampicilina 50 μ g/ml. Se dejó crecer toda la noche a 37 $^{\circ}$ C y agitación orbital a 200 rpm para luego hacer una minipreparación como se detalló anteriormente.

Para obtener los plásmidos pET21-dCP2 y pET21-dCP1 se llevó a cabo una estrategia para amplificar la región de interés, y luego, mediante el uso de las enzimas *Bgl*III y *Kpn*I, se clonó el fragmento en el vector original.

PCR para amplificar las regiones de interés

pET21-dCP2

Para la obtención del plásmido pET21-dCP2, se hizo una PCR (PCR 1) en la que se utilizó el pET28-mSA como templado y se utilizaron los cebadores 1 y 3, los cuales fueron diseñados como se muestra en la **Fig. 16**. Posteriormente, se hizo una segunda reacción de amplificación (PCR 2) para extender el fragmento hasta un sitio de corte único de *Kpn*I. Utilizando el amplicón de la primera como templado y los cebadores 1 y 2, obteniéndose un fragmento de 173 pb.

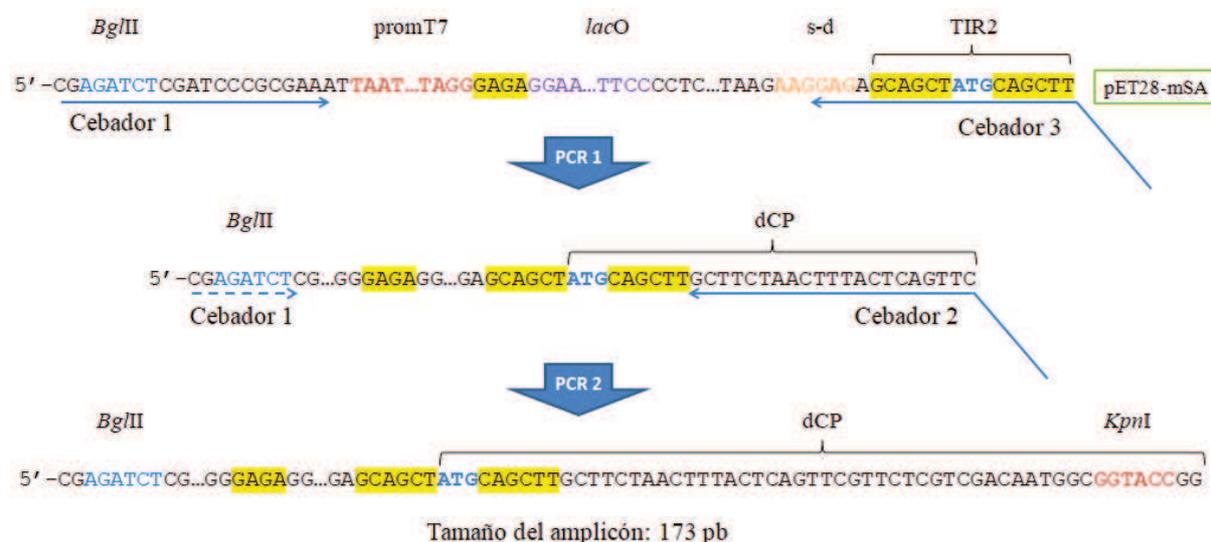


Figura 16: Estrategia para obtener el pET21-dCP2. Consiste en 2 PCRs sucesivas, donde el templado de la segunda es el producto de la primera. En amarillo se resaltan las regiones de interés, se muestra el sitio de corte de las enzimas de restricción *Bgl*III y *Kpn*I, promT7 (promotor), *lacO* (operador lac), s-d (secuencia Shine-Dalgarno), TIR2 (secuencia de interés) y dCP.

Para cada PCR se utilizó un volumen final de 25 μ l, donde las concentraciones finales de los reactivos fueron las siguientes: 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1X PCR Buffer, cebadores 0,5 μ M, Taq ADN polimerasa (Thermo Fisher Scientific) 0,025 U/ μ l y 0,5 - 2 μ l de templado.

Los cebadores utilizados fueron sintetizados químicamente (Genbiotech SA. CABA) y se detallan a continuación:

Cebador 1: 5´ -CGAGATCTCGATCCCGCGAA-3´

Cebador 2: 5´-CCGGTACCGCCATTGTTCGACGAGAACGAACTGAGTAAAGTTAGAAGC-3´

Cebador 3: 5´-GAACTGAGTAAAGTTAGAAGCAAGCTGCATAGCTGCTCTC-3´

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las descritas en la **Tabla 5**.

Para evaluar los resultados, los tubos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa 3% teñidos con Bromuro de Etidio [0,05 mg/ml] y la corrida electrofórica fue llevada a cabo como se mencionó anteriormente.

pET21-dCP1

Se llevó a cabo una estrategia similar a la anterior, pero para la obtención del pET21-dCP1 no se utilizó el cebador 3, sino el 4, diseñado de tal manera que no amplifique las 6 bases río abajo de la región TIR2 (**Fig. 17**).

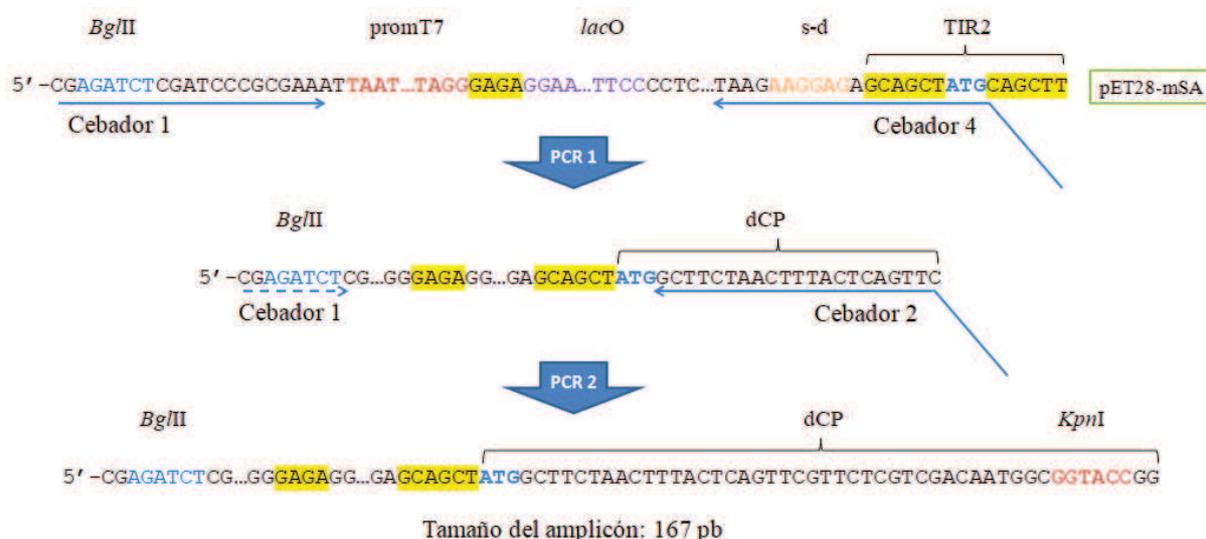


Figura 17: Estrategia para obtener el pET21-dCP1. Consiste en 2 PCRs sucesivas, donde el templado de la segunda es el producto de la primera. En amarillo se resaltan las regiones de interés, se muestra el sitio de corte de las enzimas de restricción *BglII* y *KpnI*, *promT7* (promotor), *lacO* (operador *lac*), *s-d* (secuencia Shine-Dalgarno), *TIR2* (secuencia de interés) y *dCP*.

Las condiciones utilizadas para las PCRs fueron iguales a las descritas previamente.

Cebador 4: 5´-CGAACTGAGTAAAGTTAGAAGCCATAGCTGCTCTCCTTCTTAAAG-3´

Los pasos que siguen a continuación se llevaron a cabo tanto para la obtención del pET21-dCP2 como el pET21-dCP1.

Ligación en vector pGEM-T y transformación (cepa DH5-α competentes)

El siguiente paso involucraría la restricción del fragmento de PCR. Sin embargo, debido a que los sitios de restricción están en los extremos del amplicón, lo que implica una baja eficiencia de corte, se llevó a cabo una clonación del amplicón en un vector T, y luego se realizó la restricción. En la PCR se utilizó la ADN polimerasa Taq, de manera que el fragmento obtenido posee una adenina terminal no apareada. Por lo tanto, se

hizo una ligación del amplicón con un vector T conteniendo timidinas terminales para su ligación.

La ligación fue llevada a cabo utilizando el kit pGEM-T Easy (Promega Corp. Madison, WI). Se mezcló 1 μ l del vector pGEM-T, 5 μ l de Rapid Ligation Buffer 2X, 1 μ l de T4 ADN ligasa, 2 μ l de la PCR2 y agua bidestilada para llevar a volumen final de 10 μ l. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y luego se dejó toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se hizo una transformación de la ligación en bacterias *E. coli* cepa DH5- α competentes, el protocolo utilizado fue el detallado previamente.

PCR de colonias

A partir de las colonias bacterianas obtenidas se llevó a cabo una PCR de colonias con los cebadores 1 y 2 anteriormente utilizados. De esta manera, los clones que amplificaron una banda de aproximadamente 170 pb en geles de agarosa 1,2%, identifican clones con el inserto. Precisamente, para el caso del pET21-dCP2 el amplicón era de 173 pb, y para el pET21-dCP1 era de 167 pb. Para llevar a cabo la PCR de colonias esto se procesaron 10 colonias de cada plásmido y se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente.

Cultivo de bacterias conteniendo el plásmido pGEM-T y Minipreparación

Se seleccionaron 2 clones para cada plásmido en los cuales se obtuvo el fragmento de PCR del tamaño esperado, identificando el inserto deseado. Los clones seleccionados fueron crecidos en 5 ml de LB con Ampicilina 50 μ g/ml y posteriormente se hizo una minipreparación de ADN para purificar el plásmido.

Corte de ADN mediante las enzimas de restricción *KpnI* y *BgIII*

Luego se llevó a cabo la restricción del plásmido pGEM-T con las enzimas *KpnI* y *BgIII*. Primero se incubó con 1 μ l de *KpnI*-HF (Cat. R3142S, NEB. Ipswich, MA), 3 μ l de buffer Cutsmart (10X) y 26 μ l de agua bidestilada conteniendo el plásmido purificado. Se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Luego se agregó 1 μ l *BgIII* (Cat. R0144S, NEB), 0,5 μ l del mismo buffer Cutsmart (10X) y 3,5 μ l de NaCl 1M, como recomienda el proveedor, y agua bidestilada hasta un volumen final de 35 μ l. Se dejó toda la noche a 37 °C.

Por otro lado, se realizó la restricción del vector “receptor” (pET21-dCP) (**Fig. 18**) con las mismas enzimas y condiciones. Luego de la restricción, se desfosforiló el vector con rSAP (Shrimp Alkaline Phosphatase #M0371. NEB) para evitar el religado. Se agregó al tubo de restricción, 1 μ l de rSAP y se incubó 30 minutos a 37 °C, luego se inactivó la enzima mediante la incubación a 65 °C durante 5 minutos.

Ligación de los fragmentos de ADN y transformación (cepa DH5- α competentes)

Para las ligaciones se incubó 2 μ l del vector pET21-dCP (50 ng) cortado con las enzimas *KpnI* y *Bg/II*, 3 μ l del inserto cortado con las mismas enzimas (5 ng), 1 μ l de Ligation Buffer 10X (Promega Corp. Madison, WI), 1 μ l de T4 ADN ligasa (Promega Corp. Madison #M0202S, WI) y agua bidestilada para llevar a un volumen final de 10 μ l. Se hizo un control de religado en el cual no se incluyó el inserto. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente y luego se dejó toda la noche a 4 °C. Luego se hizo una transformación de la ligación en bacterias *E. coli* cepa DH5- α competentes.

PCR de colonias

Para la detección de colonias conteniendo los respectivos constructos de interés se llevó a cabo una PCR de colonias con los cebadores 1 y 2 de 5-15 colonias de cada plásmido a obtener. Se utilizaron las mismas condiciones descritas anteriormente.

Para el caso del pET21-dCP2 aquellas colonias que amplificaron un fragmento de 173 pb contienen el fragmento deseado, para el caso del pET21-dCP1, 167 pb indica que contiene el fragmento deseado, mientras que las colonias que amplificaron un fragmento de 205 pb identificaron a clones conteniendo plásmidos sin cortar o religados. Se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler™ 50 bp Ladder (Thermo Fisher Scientific) para estimar el tamaño de los fragmentos amplificados.

Evaluación y comparación del crecimiento bacteriano

Cultivo de bacterias *E. coli* cepa DH5 α conteniendo los plásmidos de interés

De las bacterias DH5- α conteniendo las construcciones deseadas, se seleccionaron 1-3 clones de cada plásmido (pET21-dCP0, pET21-dCP2 y pET21-dCP1), los cuales fueron inoculados en 5 ml de LB con Ampicilina 50 μ g/ml, para luego hacer una minipreparación.

Preparación de bacterias competentes *E. coli* cepa BL21(DE3) y transformación

Con los plásmidos purificados se procedió a transformar bacterias competentes *E. coli* cepa BL21(DE3), las cuales se utilizan para la expresión de proteínas recombinantes bajo la regulación del promotor T7¹¹⁴. Para la preparación de las bacterias competentes y para la transformación se repitieron los protocolos previamente detallados. Se seleccionaron 3-5 clones de cada plásmido para ser inoculados en LB con el respectivo antibiótico. Se realizó un stock glicerol al 20% de los mismos y se conservaron a -80 °C.

Evaluación de crecimiento bacteriano a 37 °C y a 28 °C

Finalmente se evaluó el crecimiento bacteriano y luego la expresión de la proteína recombinante de los clones obtenidos. Se analizó el crecimiento a 37 °C y también a 28 °C,

considerando que disminuir la temperatura de crecimiento podría optimizar la expresión de la proteína recombinante de interés¹¹⁵, lo cual se analizará posteriormente. Para esto se inocularon 3-5 clones de cada plásmido en 5 ml LB con Ampicilina 50 µg/ml y se pusieron a crecer toda la noche a 37 °C. Luego se inoculó 1 ml de cultivo en 25 ml de LB con Ampicilina 50 µg/ml. Se cultivaron a 37 °C o 28 °C y cuando la OD_{600nm} se encontró entre 0,5-0,7 se indujo la expresión con IPTG [0,5 mM] (tiempo 0 h). Para el caso del experimento a 37 °C, se midió la OD_{600nm} a las 0 h, 2 h y 4 h, y para el caso de 28 °C se midió a las 0 h, 2 h, 3 h, 4 h y 6 h. Se tomaron alícuotas de 1 ml del cultivo a 37 °C justo antes de la inducción del cultivo (0 h) y a las 4 h. Se evaluó la OD_{600nm}, se centrifugó 20 segundos a máxima velocidad y se resuspendió el pellet en Laemmli buffer 2X (**Tabla 6**) a una concentración de 2,5 µg/µl de proteína. Para el cálculo de volumen de Laemmli buffer se tomó como parámetro la siguiente relación: 1,25 OD = 1x10⁹ células/ml = 150 µg/ml de proteína¹¹⁶. También se tomaron alícuotas del cultivo a 28 °C a las 0 h y a las 6 h y se llevó a cabo el mismo procedimiento. Como se detalló, los experimentos a 37 °C se evaluaron hasta las 4 h post-IPTG y los experimentos a 28 °C se evaluaron hasta las 6 h post-IPTG, esto se llevó a cabo de esta manera para obtener ODs comparables. Las curvas de crecimiento se hicieron por triplicado y se evaluaron utilizando el Software GraphPad Prism 8.0.2 donde se realizó el análisis estadístico ANOVA de 2 vías con post test tukey.

Tris-HCl pH 6,8	125 mM
SDS	4%
Glicerol	16%
2-mercaptoetanol	9%
Azul de bromofenol	0.03%

Tabla 6: Composición Laemmli Buffer 2X

Se mezcló el Tris-HCl, el SDS, el glicerol, agua bidestilada y se agitó a 40 °C para disolver los componentes. Luego se agregó el 2-mercaptoetanol y el azul de bromofenol, y agua bidestilada para llevar al volumen deseado. Se alícuotó y conservó a -20°C.

Evaluación y comparación de la expresión mediante SDS-PAGE

Las muestras obtenidas fueron evaluadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Los reactivos utilizados para la preparación de los geles se detallan en la **Tabla 7**.

	Running 12%	Stacking
Agua bidestilada	1000 μ l	1381,5 μ l
acrilamida:bisacrilamida (29%:1%)	2000 μ l	333,5 μ l
Tris-HCl 1M pH 8.8	1875 μ l	-
Tris-HCl 1M pH 6.8	-	250 μ l
SDS 10%	50 μ l	20 μ l
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	12.5 μ l	12.5 μ l
Amonio peroxodisulfato (APS) 10%	60 μ l	20 μ l

Tabla 7: Reactivos utilizados para los geles de acrilamida

Previo a la siembra, las muestras fueron incubadas en agua hirviendo durante 5 minutos. Se utilizó el estándar de proteínas preteñidas PageRuler™, de 10 a 180 kDa (Thermo Fisher Scientific). Se realizó la electroforesis a 15-25 mA durante 90 minutos en una cuba Enduro VE10 (LabNet International Inc. Edison, NJ) o Mini-PROTEAN® 3 (Biorad Laboratories. Hercules, CA). Los geles se fijaron con solución decolorante (50% metanol:10% ácido acético) durante 30 minutos, luego se incubaron toda la noche con solución Coomassie Blue R250 (0,05 %P/V) en el mismo buffer anteriormente mencionado. Posteriormente se lavaron con solución decolorante durante 2-3 h y luego se utilizó decolorante suave (27% metanol:10% ácido acético) durante 2-3 h. Para la cuantificación de las bandas de los geles se utilizó el software ImageJ 1.52a (Wayne Rasband. NIH).

Purificación de VLPs-MS2

Considerando que cada VLPs-MS2 está conformada por 90 subunidades del dímero (peso molecular 27,8 kDa), la estructura a purificar tiene un peso molecular calculado de 2505 kDa.

Cromatografía de exclusión por tamaño molecular (SEC)

Los clones de bacterias BL21(DE3) conteniendo los plásmidos fueron cultivados bajo las mismas condiciones descritas previamente, pero en un volumen final de 200 ml de medio LB en un erlenmeyer de 500 ml. Luego de la inducción de la expresión, mediante la adición de IPTG [0,5 mM], se colectaron las células y centrifugaron a 1800xg durante 30 min. El pellet bacteriano se resuspendió en 10 ml de buffer NaNO (Tris-HCl 20mM (pH 8,0) - NaNO₃ 100mM). Luego se sonicó durante 10 ciclos de 50 segundos y 10 segundos de descanso a una amplitud de 40% con micropunta mediana (1-15 ml) en el sonicador Sonics Vibra Cells VCX-500 (Sonics and Materials Inc.; Newton, CT).

Finalmente, se centrifugó nuevamente durante 30 minutos y el sobrenadante se filtró (0,22 μm de Corning Inc.; Corning, NY).

El sobrenadante filtrado (5 ml) se concentró mediante columna Vivaspin 2 100kDa MWCO (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, UK) a un volumen final de 1 ml (centrifugación a 1500g). Se equilibró con buffer NaNO mediante una bomba peristáltica BQ50-1J (Longer Precision Pump Co. Hebei, China) una columna de Sefarosa CL-6B (Cytiva Life Sciences. Marlborough, MA) de 18 cm^3 de volumen ($h=15$ cm, $r=0,6$ cm). Se sembró el concentrado conteniendo las VLPs y posteriormente se agregó buffer NaNO a un flujo de 0,5 ml/min. Se tomaron 20 alícuotas de 1 ml y se evaluaron midiendo la concentración de proteína y la relación de absorbancia 260/280 (nm) mediante Nanodrop. Se calculó el coeficiente de extinción molar mediante el software Vector NTI. También se evaluó la expresión sembrando en geles SDS-PAGE. A partir de la/s fracción/es con mayor cantidad y pureza de proteína recombinante, se realizó el análisis de las nanopartículas mediante Dispersión de Luz Dinámica (*Dual Light Scattering*, DLS) utilizando el equipo DynaProNanostar (Wyatt Technology. Santa Barbara, CA), mediante colaboración con Gabriel Ybarra - Centro de Procesos Superficiales, INTI. También se utilizó Microscopía Electrónica de Transferencia (MET) utilizando el equipo Zeiss EM 109-T, con cámara digital Gatan ES100W, perteneciente al Servicio Técnico de Microscopía del Instituto de Biología Celular y Neurociencia del LANAIS-MIE (UBA-CONICET). Para la microscopía las muestras fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico, que tiñe los residuos de lisina y arginina¹¹⁷. Se evaluó el tamaño de las estructuras obtenidas en las imágenes utilizando la barra de referencia, cuantificando mediante el software ImageJ. El histograma de frecuencias se realizó mediante el software Graphpad.

Filtración de Flujo Tangencial (TFF)

Se llevó a cabo una segunda estrategia de purificación mediante filtración de flujo tangencial utilizando una membrana de 1000 kDa. El procesamiento de las bacterias se llevó a cabo de la misma manera previamente detallada, pero con dos diferencias. En primer lugar, previo al sonicado, se agregó lisozima 0,05 mg/ml (Sigma Aldrich. Saint Louis, MO) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. En segundo lugar, luego del sonicado, se agregó ARNasa 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Sigma Aldrich. Saint Louis, MO), ADNasa 5 U/ml (Sigma Aldrich. Saint Louis, MO) y buffer ADNasa (1mM Ca_2Cl_2 y 3 mM MgCl_2) y se incubó durante 90 minutos a 37 °C. Finalmente, se centrifugó nuevamente durante 30 minutos y el sobrenadante se filtró (0,22 μm de Corning Inc.; Corning, NY).

El sobrenadante filtrado se llevó a un volumen final de 250 ml con Buffer NaNO y se realizó una ultrafiltración utilizando un cartucho de filtración de 1000 KDa Minimate TFF - 1000k Membrane (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI) utilizando una bomba peristáltica TPM Pump Pro (Watson Marlow Ltd, UK). Se filtró la muestra a un flujo de filtración de 3 ml/min. Cuando el volumen del retentado alcanzaba los 10 ml, se diluyó a 250 ml con Buffer

NaNO nuevamente y se concentró a 10 ml. Al retentato obtenido se le agregó 4 volúmenes de agua bidestilada, para obtener una concentración final de Tris-HCl 4 mM (pH 8,0) - NaNO₃ 20 mM. Este volumen se sembró en una columna de intercambio catiónico Sartobind S 3 ml (Sartorius AG, Goettingen, Alemania) y luego se lavó con 10 ml (3 volúmenes) de Tris-HCl 4 mM (pH 8,0) - NaNO₃ 20 mM. Posteriormente se realizó un segundo lavado con 5 ml de buffer NaNO y finalmente se eluyó mediante 5 ml de Buffer NaNO 250 (Tris-HCl 20mM (pH 8,0) - NaNO₃ 250 mM) dividido en 5 alícuotas de 1 ml que rápidamente se les agregaron 1,5 volúmenes de Tris-HCl 20 mM para mantener la concentración final de 100 mM de NaNO₃. Las alícuotas se evaluaron midiendo la concentración de proteína y la relación de absorbancia (nm) 260/280 mediante Nanodrop y también se sembraron en geles SDS-PAGE. El análisis de las nanopartículas se llevó a cabo mediante DLS.

El segundo objetivo de esta tesis consiste en encapsular QDs dentro de las VLPs-MS2. Para esto, primero se llevó a cabo un protocolo para recubrir los QDs con la región TR. Luego se llevó a cabo un protocolo para desensamblar las nanopartículas.

Preparación de nanoestructuras en base a QDs

Para que tengan los QDs capacidad de unión a la cara interna de las VLPs-MS2, se llevaron a cabo 2 protocolos para cubrirlos con albúmina y con la región TR,

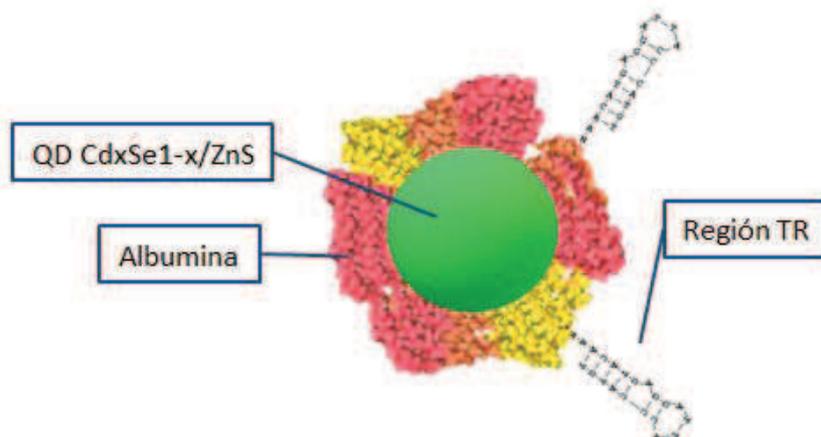


Figura 20: Representación esquemática de molécula reportera. Se representa con una esfera verde el QD de CdxSe1-x/ZnS, recubierto con albúmina para solubilizarlo y con la región TR para que pueda ser encapsulado en las VLPs-MS2

Mediante modificaciones químicas

1. A un tubo eppendorf se le agregaron 200 µl de acetonitrilo (Sintorgan S.a. Villa Martelli, Bs As, Argentina), 1 µl de QDs (5 mg/ml #FN-525-A-10MG. Cytodiagnosics. Burlington, Canadá) y 10 µl de protein mix (Servicio de Sondas - CONICET - UNSAM).
2. Se dejó incubar 15 minutos a temperatura ambiente.

3. Se le agregaron 800 μl de agua milliQ, 8 μl de Buffer Fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3M pH=7) (Sigma Aldrich) y 10 μl de Reactivo entrecruzante (Servicio de Sondas - CONICET - UNSAM).
4. Se incubó 60 minutos en agitación suave a temperatura ambiente.
5. Se sembró en una columna de Sefarosa CL-6B (Cytiva) de 8 ml de volumen equilibrada con Buffer Fosfato Salino (PBS) 1X. Se eluyó con PBS 1X, colectando 8-10 fracciones de 1 ml.
6. Mediante luz UV, se detectaron los QDs en las fracciones 4 y 5.
7. Se juntaron las fracciones y se le agregó 0.1 mg/ml de Albúmina Sérica Humana (HSA) (Laboratorio de Hemoderivados, Univ. Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina).
8. Se incubó toda la noche a 4 °C.
9. Se le agregó 20 mM de sulfito de sodio (Na_2SO_3).
10. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
11. Se dividió en 2 tubos eppendorf y se centrifugó durante 5 minutos a 16.000g.
12. Se descartó el sobrenadante y resuspendió cada pellet en 100 μl de agua milliQ.
13. Se le agregó a cada tubo 1 μl de Reactivo entrecruzante y se dejó incubar 45 minutos a temperatura ambiente en agitación suave.
14. Se sembró en una columna PD-10 con resina Sephadex G-25 (Cytiva) de 1,5 ml equilibrada con PBS 1X. Se eluyó con PBS 1X, colectando 8-10 fracciones de 200 μl .
15. Mediante luz UV, se detectaron los QDs en la fracción 3.
16. Se le agregó 50 μl de NH-TR 100 μM (5' - NH_3 -AACATGAGGATTACCCATGT - 3') o la región TR sin amino 100 μM (5' - AACATGAGGATTACCCATGT - 3') y albúmina acetilada 0,1 mg/ml y se incubó toda la noche a 4 °C.

Mediante sono-química

1. Se preparó 1 ml de una solución 80% Cloroformo / 20% Metanol (Fase orgánica).
2. En un tubo de 2 ml se agregaron 900 μl de la Fase orgánica y 20 μl de QD (5 mg/ml #FN-525-A10MG. Cytodiagnosics. Burlington, Canadá)
3. Luego se agrega 300 μl HSA (10 mg/ml) y 12 μl de Reactivo entrecruzante (Servicio de Sondas - CONICET - UNSAM)
4. Se agregó 743 μl de PBS para obtener un volumen final de 1,8 ml (50% fase acuosa/50% fase orgánica).
5. Para generar la microemulsión de las fases, se sonicó 3 minutos a una amplitud de 40% con punta mediana
6. Se centrifugó 5 minutos a máxima velocidad en centrífuga de mesada.

7. Se tomó 1ml del sobrenadante (fase acuosa + metanol) conteniendo los QD recubiertos en albúmina y se transfirió a un nuevo tubo.
8. Se realizó una breve centrifugación para sedimentar macroestructuras y se tomó el sobrenadante.
9. Al sobrenadante conteniendo los QDs recubiertos en albúmina, se agregan 10 μ l de NH-TR 100 μ M (5' - NH₃-AACATGAGGATTACCCATGT - 3'), primer NH₃-H1 100 μ M (5' - NH₃-CGGAATTCCGAGCGTGGGCGT - 3') o Glicina (1M en Tris-HCl 200 mM pH 8,0) a cada preparación.
10. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 h.
11. Al finalizar se agrega Glicina para bloquear los posibles sitios reactivos.
12. Se centrifuga 10 minutos a 13000xg. y se resuspende en PBS 1X.

Desensamblado de VLPs-MS2 purificadas

Se partió de una solución concentrada de VLPs-MS2 (2,5 mg/ml) mediante columna Vivaspin-2 (centrifugación a 1500g). Se agregó mediante goteo suave 2 volúmenes de Ácido Acético glacial (17 M), y luego se mantuvo en hielo durante 30 minutos. Se centrifugó a 6600g a 4 °C durante 20 minutos. El sobrenadante se sembró en una columna PD-10 Sephadex G-25 (Amersham Pharmacia. Amersham, Reino Unido) equilibrada con Ácido Acético 1 mM. Se colectaron las fracciones correspondientes y se evaluó la presencia de proteínas mediante OD_{280nm} en Nanodrop.

RESULTADOS

Obtención de los plásmidos de interés

Teniendo en cuenta el objetivo del presente trabajo de optimizar la producción de VLPs, en relación al plásmido de expresión, se realizaron 2 abordajes. Por un lado, partiendo del plásmido con el que contaba el laboratorio (pET21-dCP), se desarrolló una estrategia para eliminar la secuencia codificante del T7 leader (pET21-dCP0), ya que se habían observado bajos niveles de expresión de proteína recombinante. Por otro lado, para aumentar la expresión de la proteína recombinante CP, se planteó una estrategia de clonado para optimizar el promotor T7 y la región TIR (pET21-dCP2 y pET21-dCP1), según lo propuesto por los autores mencionados anteriormente¹⁰⁹ (**Fig. 21**).

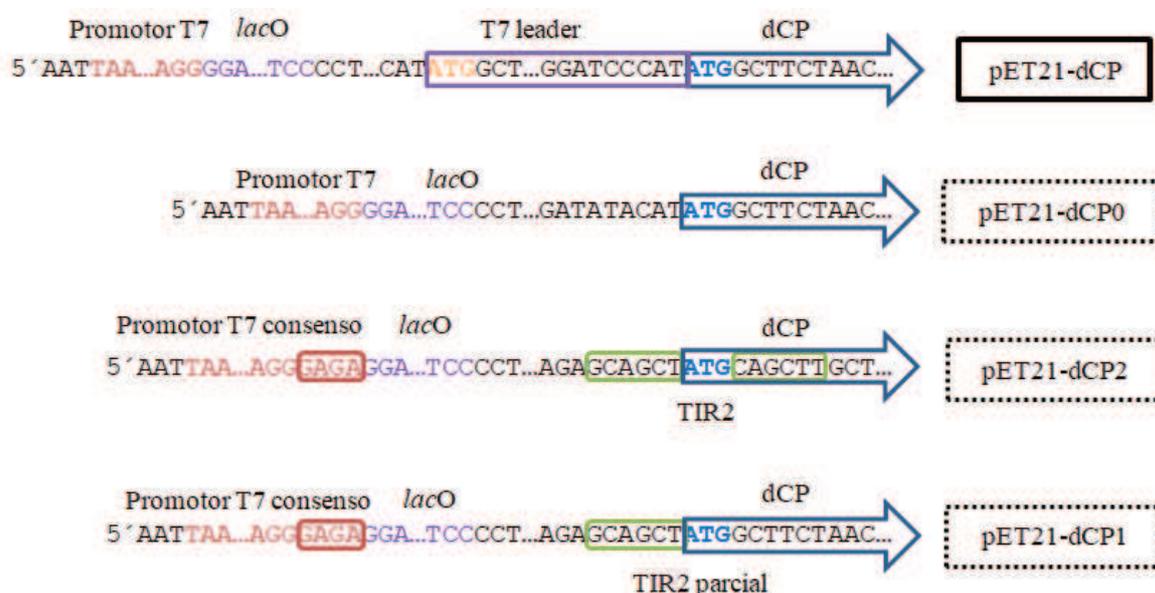


Figura 21: Esquema de plásmidos de expresión de dCP. Secuencia del plásmido original con el que contaba el laboratorio (pET21-dCP), y los plásmidos a obtener durante este trabajo. El recuadro rojo muestra las 4 bases agregadas al promotor T7, y los recuadros verdes señalan las bases alternativas de la región TIR.

PCR de colonias bacterianas

Se diseñó una PCR de colonias bacterianas con los cebadores 1 y 2 sobre las bacterias *E. coli* cepa DH5- α transformadas con la ligación de los fragmentos de ADN que permiten obtener los plásmidos con las secuencias esperadas. Esta estrategia permite acortar los tiempos de análisis, ya que no es necesario realizar una minipreparación de ADN para identificar clones positivos. La PCR de colonias detecta los clones positivos según el tamaño del amplicón esperado, ya que el fragmento amplificado depende de la secuencia de la región promotora presente en el plásmido (**Fig. 22**).

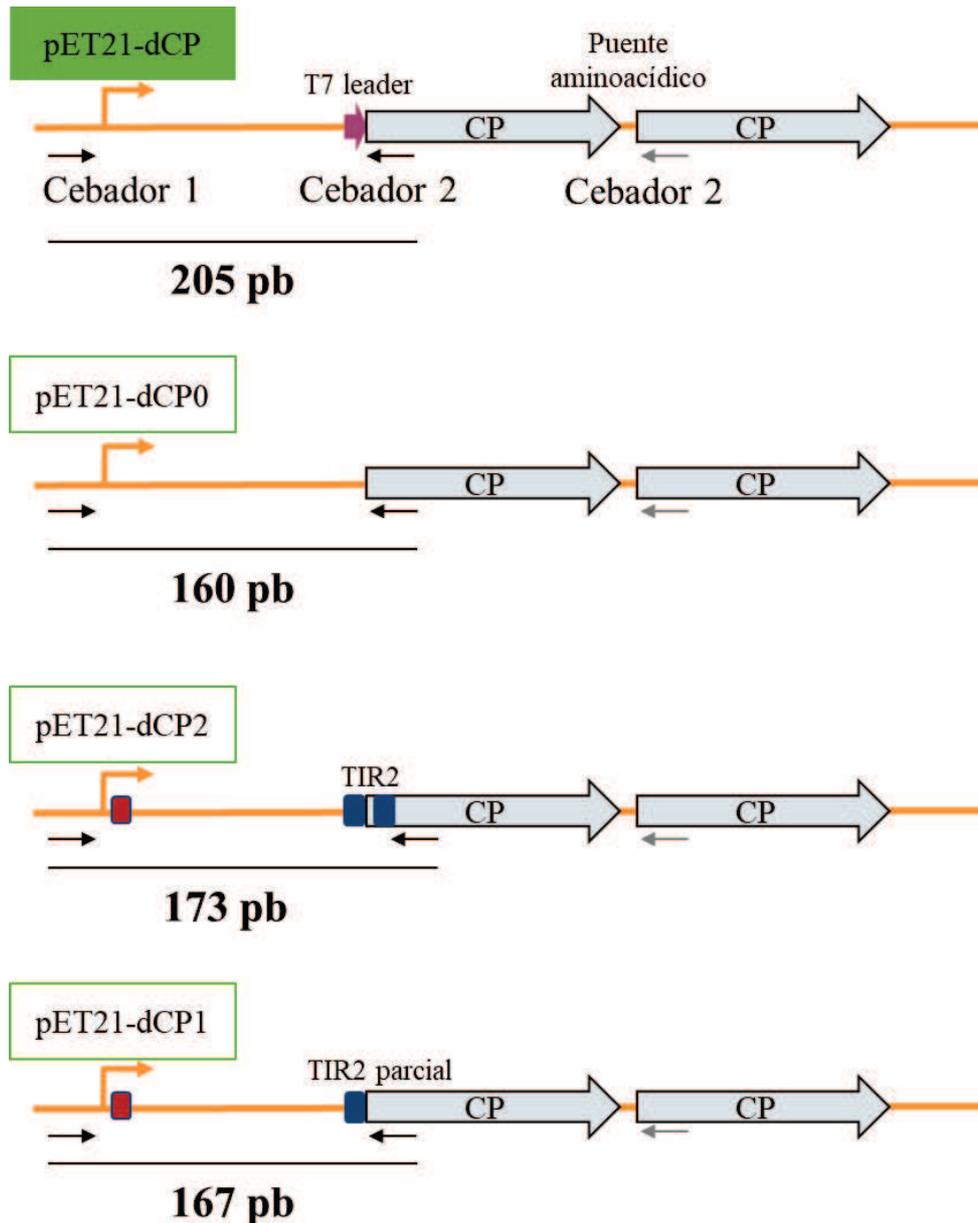


Figura 22: Tamaño del amplicón generado por los distintos plásmidos a partir de la PCR de colonias bacterianas. La flecha naranja simboliza el promotor, el cuadrado rojo las 4 bases adicionadas al promotor, y los cuadrados azules simbolizan las bases modificadas de la región TIR. Notar que el cebador 2 también se une a la segunda subunidad del dímero de CP, lo que genera un fragmento de entre 560 y 605 pb, según el caso (flecha gris).

Se obtuvieron clones positivos para los plásmidos pET21-dCP0 y pET21-dCP2, ya que los tamaños de amplicón obtenidos en la PCR de colonias coinciden con el esperado, 160 pb y 173 pb, respectivamente (**Fig. 23**). Aunque la amplificación de las secuencias permite confirmar el tamaño de la región promotora y del inicio de la transcripción, esto no permite conocer la identidad de los nucleótidos que la componen. Para confirmar la obtención de la secuencia esperada se deben secuenciar los clones obtenidos.

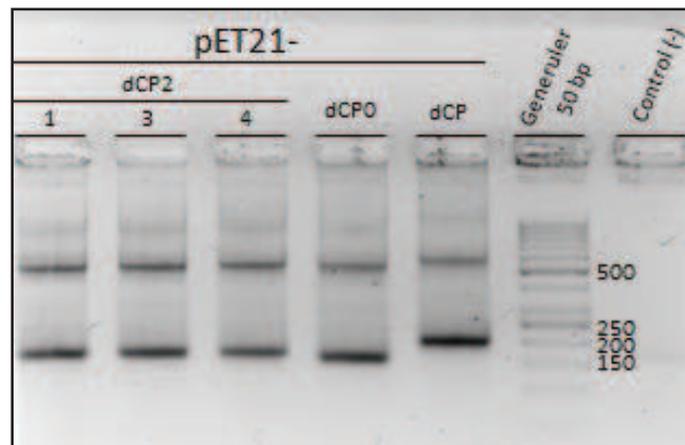


Figura 23: Corrida electroforética de la PCR de colonias bacterianas. Electroforesis en gel de agarosa donde se observan los fragmentos amplificados. Para el pET21-CP2 se esperaba un fragmento de 173 pb, para el pET21-dCPO se esperaba uno de 160 pb, y para el pET21-dCP uno de 205 pb. La banda de 560-605 pb que se observa en todas las calles se debe a la unión del cebador 2 a la secuencia de la segunda subunidad del dímero de CP que posee un porcentaje de identidad del 95%.

Secuenciación

Para confirmar que las secuencias obtenidas de los plásmidos pET21-dCPO y pET21-dCP2 eran las deseadas, se secuenció el clon 3 de dCP2 y el clon de dCPO utilizando el método de Sanger por electroforesis capilar (Macrogen Inc. Seúl, Corea del Sur). En primer lugar y como se esperaba, en el pET21-dCP no se observa la secuencia codificante del T7 leader (**Fig. 24**).

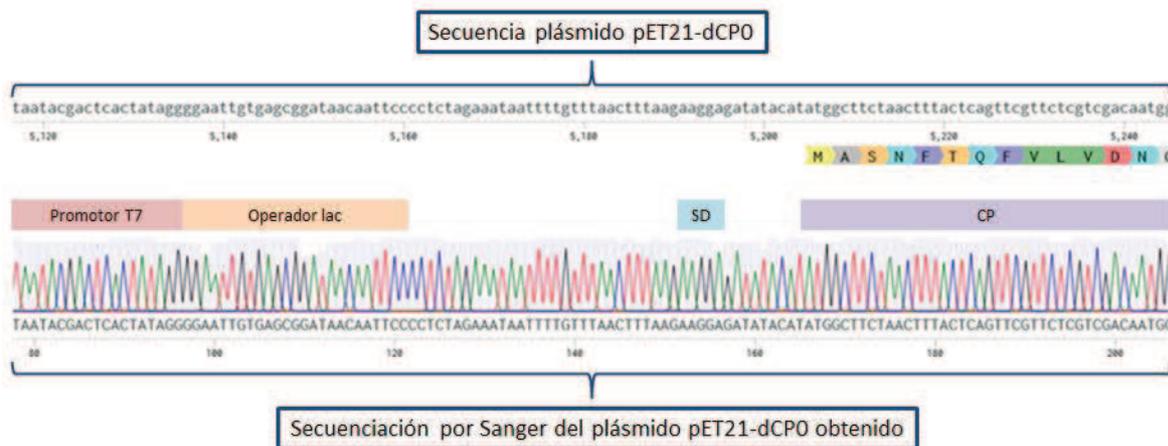


Figura 24: Alineamiento del pET21-dCP. Las secuencias fueron analizadas utilizando la plataforma online <https://www.benchling.com/>, donde se alineó la secuencia construida mediante el software Vector NTI 11.5 (Thermo Fisher Scientific) con el cromatograma de la secuenciación capilar del plásmido pET21-dCPO.

En segundo lugar, también se obtuvo la secuencia esperada del plásmido pET21-dCP2, en el cual fueron agregadas las 4 bases al promotor y se modificaron las 6 bases río

abajo y las 6 bases río arriba del ATG (**Fig. 25**). Vale la pena mencionar que se detectó un error en la secuencia esperada (T → G), pero al no estar en el promotor ni la región de unión al ribosoma se consideró que no afectaría la expresión, por lo que se avanzó con la evaluación de la expresión de la proteína recombinante.

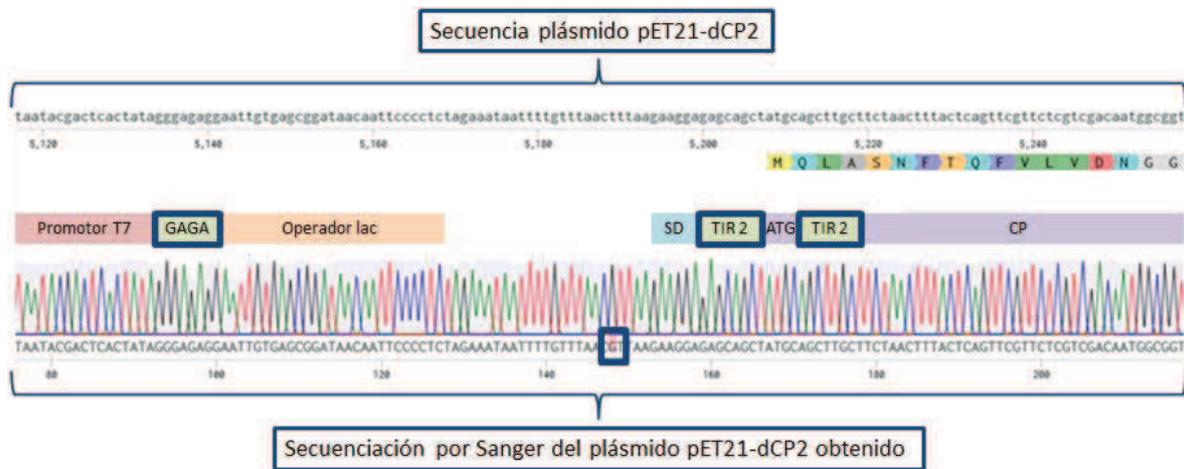


Figura 25: Alineamiento del pET21-dCP2. Las secuencias fueron analizadas de la misma manera previamente detallada. Con recuadros azules se marcan, las 4 bases adicionales del promotor (izquierda), la mutación (centro) y la región TIR2 (derecha).

Con respecto al pET21-dCP1, no se lograron obtener clones positivos conteniendo este plásmido. De todas maneras, si se obtuvo el plásmido pGEM-T conteniendo el fragmento de PCR que incluía la región de interés. Este plásmido, denominado pGEM-T-dCP1, también fue secuenciado y, aunque la secuenciación muestra amplificación inespecífica, se verificó que la secuencia era la correcta (**Fig. 26**). Por los resultados que se mostrarán luego, no se continuó con el clonado de este plásmido.

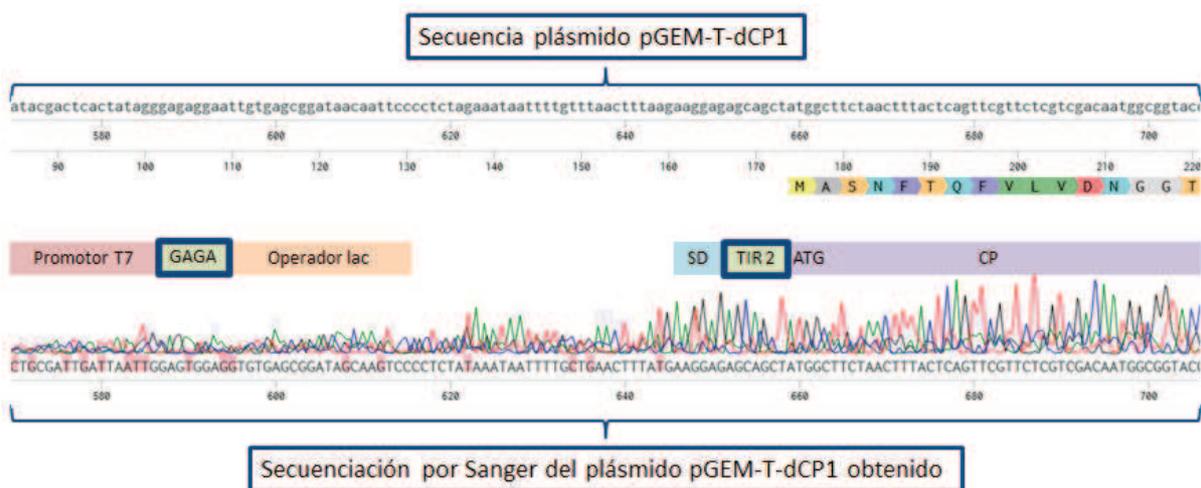


Figura 26: Alineamiento del pGEM-T-dCP1. Las secuencias fueron analizadas de la misma manera previamente detallada. Con recuadros azules se marcan, las 4 bases adicionales al promotor (izquierda), y sólo las 6 bases río arriba del ATG de la región TIR2 (GCAGCT) (derecha).

Habiendo obtenido clones de los plásmidos pET21-dCP0 y pET21-dCP2 se procedió al análisis de crecimiento y producción de proteína recombinante.

Evaluación y comparación del crecimiento bacteriano

Se transformaron bacterias *E. coli* cepa BL21(DE3) con los plásmidos obtenidos para comparar el crecimiento y la expresión de la proteína recombinante, que se ensamblan para conformar las VLPs. Se analizaron los clones obtenidos conteniendo el plásmido pET21-dCP0 (dCP0-1, dCP0-6 y dCP0-9) y los que contienen el plásmido pET21-dCP2 (dCP2-1.1, dCP2-1.2 y dCP2-4.2). La proteína recombinante producida por estos se nombró dCP0 y dCP2, respectivamente. Se descartó del análisis el plásmido original con el que contaba el laboratorio (pET21-dCP) debido a que tenían bajos niveles de producción de proteína recombinante (datos mostrados posteriormente). Previo a la comparación del ensamblado de VLPs mediado por dCP0 y dCP2, se comparó el crecimiento bacteriano entre clones para evaluar si había influencia en el crecimiento, ya sea positiva o negativa, por las modificaciones introducidas en el plásmido. Como se mencionó anteriormente se evaluó el crecimiento a 37 °C y a 28 °C, considerando que disminuir la temperatura de crecimiento podría optimizar la producción de VLPs.

A continuación se muestran las curvas de crecimiento realizadas para los 3 clones de dCP0 y 3 clones de dCP2 a 37 °C y a 28 °C (**Fig. 27**). Se observó que no hay diferencias significativas en el crecimiento bacteriano. Vale destacar que, bajo las condiciones analizadas, los clones crecieron, ya que se observan diferencias con respecto a la OD inicial.

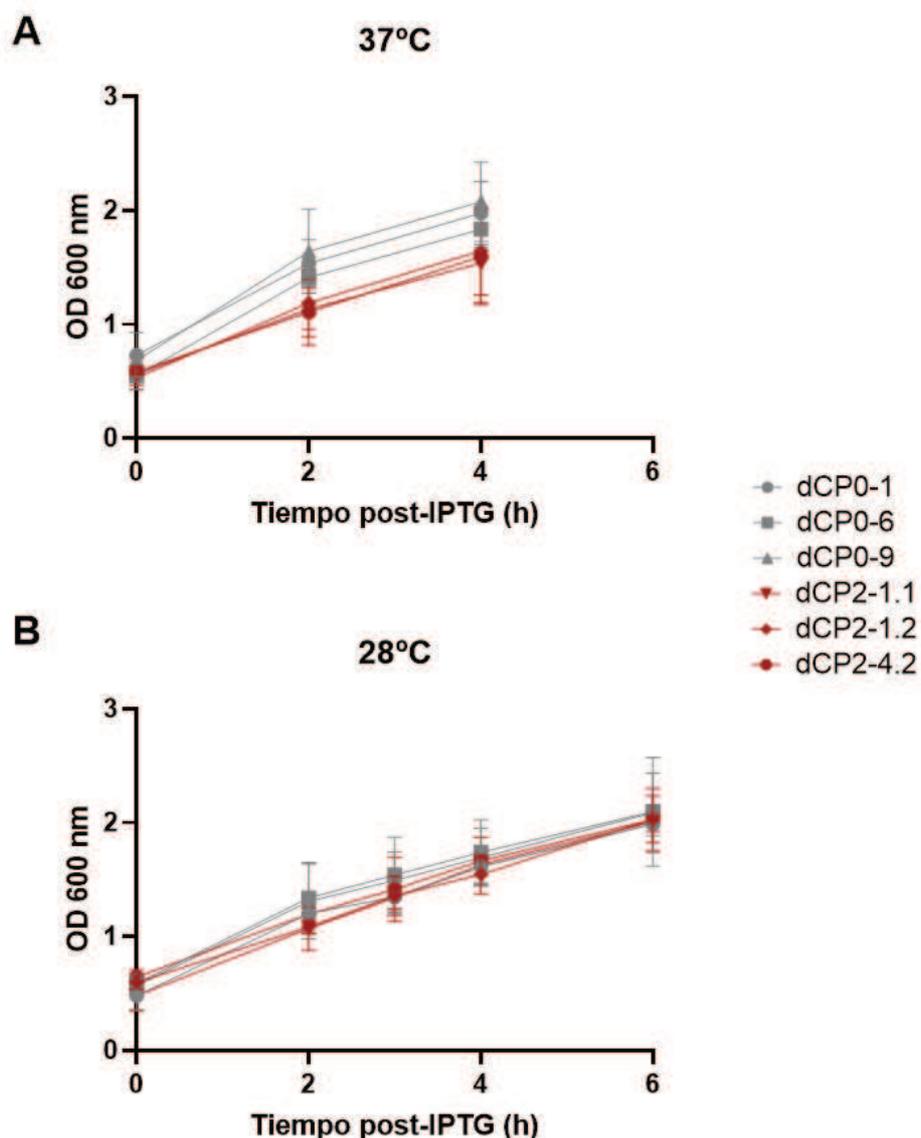


Figura 27: Crecimiento bacteriano. Curvas de crecimiento realizadas por triplicado para los 6 clones a 37 °C y a 28 °C. Se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías (clon y crecimiento) y comparación *post hoc* con prueba de tukey.

Los resultados indican que las modificaciones introducidas no afectan el crecimiento bacteriano. Por lo que, se procedió a analizar el nivel de expresión de la proteína recombinante de cada clon y a cada temperatura.

Evaluación y comparación de la expresión mediante SDS-PAGE

La expresión de la proteína recombinante dCP de los diferentes clones a las diferentes temperaturas fue evaluada mediante SDS-PAGE. Inicialmente se evaluaron los niveles de expresión de proteína recombinante sin inducción a los tiempos

evaluados y no se observaron diferencias en los mismos (datos no mostrados). Por lo que se decidió comparar los niveles de expresión a tiempo 0 y post-inducción IPTG. Se analizaron por triplicado los 6 clones mencionados en la sección anterior a 37 °C y 28 °C. Vale la pena mencionar que el plásmido pET21-dCP0 es el control, debido a que este no incluye las regiones de interés (T7 consenso y TIR2). Se observó expresión de las proteínas recombinantes dCP0 y dCP2. A continuación se muestra, a modo representativo, uno de los geles a 28 °C (**Fig. 28**). Vale la pena aclarar que, las VLPs estarían ensambladas dentro de la bacteria, pero las muestras se desnaturalizan mediante calor, un agente reductor y detergente para ser sembradas, por lo que las nanopartículas se desensamblan. Esta técnica sólo permite evaluar el nivel de proteína recombinante expresada pero no la correcta estructura de la misma, y en consecuencia, tampoco el correcto ensamblado de las VLPs.

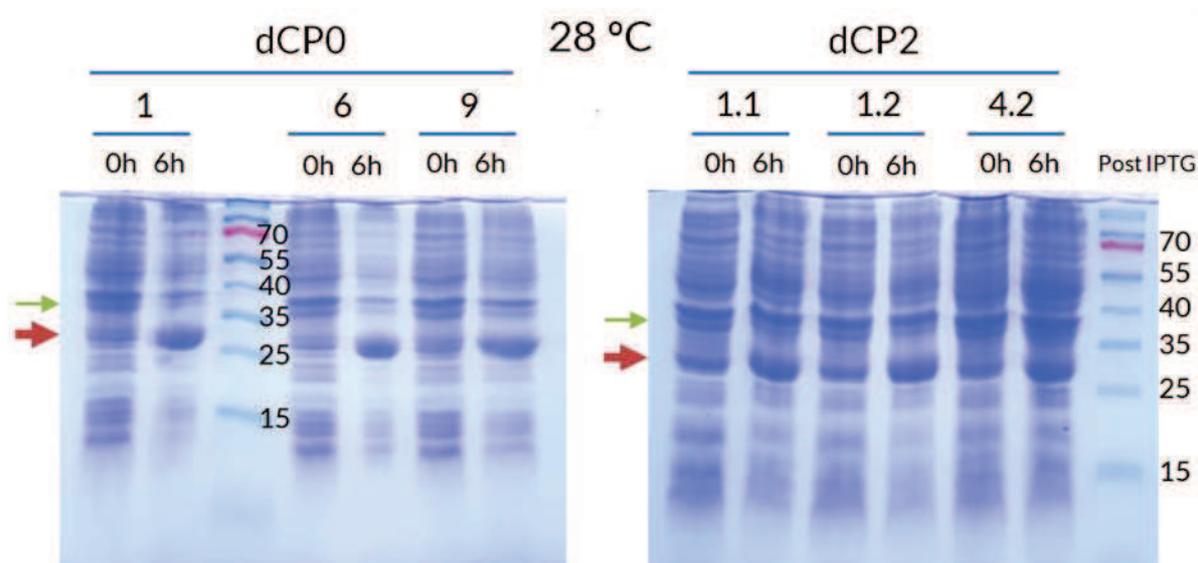


Figura 28: Cuantificación de proteína recombinante de diferentes clones. A modo representativo, se muestra un gel SDS-PAGE donde se evaluó la expresión de dCP a 28 °C. Con una flecha roja se marca la proteína recombinante dCP de 27.8 kDa, con la flecha verde se marca la doble banda utilizada para normalizar la carga proteica, corresponde a proteínas bacterianas (factor de elongación termo inestable y deshidrogenasa A).

A partir del análisis de estos geles podemos resaltar que a 37 °C no se observa un aumento en los niveles de expresión para ninguno de los clones (**Fig. 29-A**). Mientras que a 28 °C el clon dCP0-1 y dCP0-6 aumentan el nivel de expresión de dCP0 a partir de la inducción (**Fig. 29-B**). Vale resaltar que el nivel de expresión de dCP0-6 es mayor a todos los clones de dCP2.

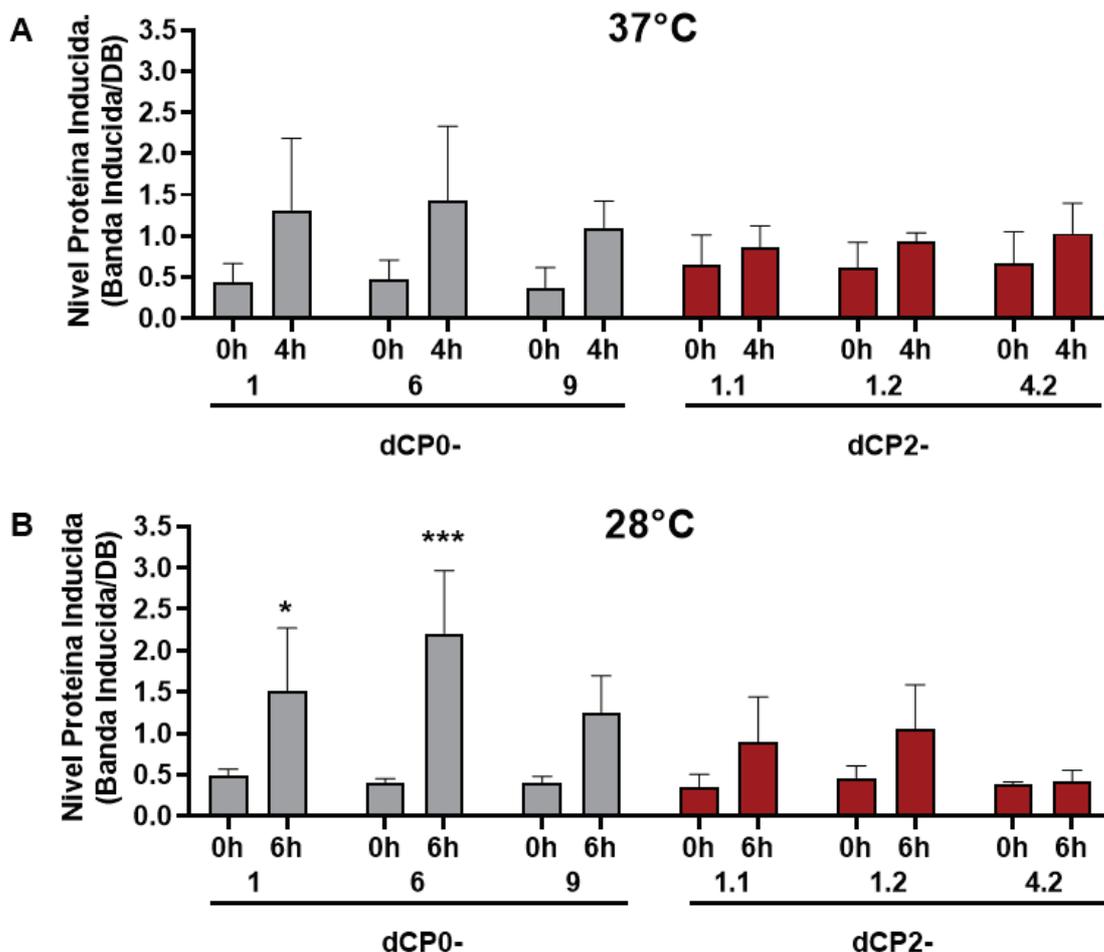


Figura 29: Cuantificación de la expresión de dCP. Nivel de expresión de la proteína recombinante dCP0 y dCP2 para los diferentes clones a 37 °C (A) y a 28 °C (B). La normalización se hizo con respecto a una doble banda (DB) que se observa en el gel. Los experimentos se hicieron por triplicado y se hizo una normalización de los mismos para evaluar el nivel de proteína recombinante inducida. Se realizó el análisis estadístico mediante ANOVA de 2 vías (clon y expresión) y comparación *post hoc* con prueba de tukey. * indica $p < 0,05$, mientras que *** indica $p < 0,001$

A partir de estos resultados, se continuó trabajando con el clon dCP0-6 a 28 °C debido a que era el que mayor nivel de proteína recombinante expresaba.

Como se mencionó en los resultados de secuenciación, no se continuó con el protocolo de clonación del pET21-dCP1 debido a que no se observó un aporte significativo de los elementos agregados al plásmido.

Finalmente, comparamos la expresión de proteína recombinante del clon obtenido dCP0-6 (crecido a 28 °C en erlenmeyer 200 ml con agitación orbital) con el clon conteniendo el plásmido original (pET21-dCP, crecido a 37 °C en biorreactor BIOSTAT Aplus, servicio brindado por la Plataforma de Servicios Biotecnológicos, UNQ),

observamos que aumentó 8 veces la expresión de la proteína recombinante bajo las nuevas condiciones evaluadas (**Fig. 30**).

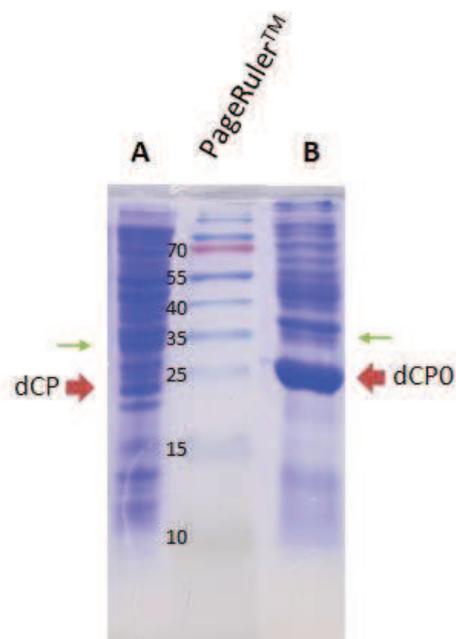


Figura 30: Cuantificación de proteína recombinante en condición inicial vs condiciones de mayor expresión. Se compara la cantidad de proteína recombinante expresada por el plásmido original (pET21-dCP) crecido a 37 °C en biorreactor BIOSTAT Aplus (A) vs el clon (dCP0-6) crecido a 28 °C en erlenmeyer con agitación orbital (B). Con flechas rojas se señalan las proteínas recombinantes y con flechas verdes se señalan las respectivas bandas utilizadas para la normalización. Foto editada (imagen original en anexo).

Aunque se obtuvieron clones que expresan proteína recombinante, esta técnica no permite evaluar la formación de VLPs, ya que se utilizan agentes desnaturizantes que desensamblan cualquier estructura supramolecular. La siguiente etapa, involucra la purificación y el análisis del ensamblado de VLPs.

Purificación de VLPs-MS2

Cromatografía de Exclusión por Tamaño Molecular (SEC)

Inicialmente, mediante la columna de cromatografía de exclusión molecular (SEC), se evaluó el ensamblado de VLPs mediado por la proteína dCP0 (clon dCP0-6). También se analizó 1 clon de dCP2 (clon dCP2-4.2) para evaluar si las modificaciones introducidas afectan la formación de las VLPs. Se observaron dificultades en la purificación de estas últimas. En las fracciones donde deberían eluir las VLPs de la columna SEC, no se cuantificaban proteínas mediante espectrofotometría. Incluso, se probó optimizando el protocolo con lisozima, ADNasa y ARNasa, y no se obtiene absorbancia a 280nm en el sobrenadante filtrado para la siembra en la columna SEC. Estos resultados indicarían que las VLPs no tendrían la estructura necesaria para mantenerse en solución.

Para el caso de dCP0 (clon dCP0-6), la proteína recombinante eluye de la columna SEC sobre todo en las fracciones 6, 7 y 8, indicando un alto peso molecular de la estructura (**Fig. 31**). No se observó proteína recombinante en el filtrado de la columna Vivaspin 2 100 kDa, indicando que la proteína recombinante (27.8 kDa) retenida estaría formando una estructura mayor a 100 kDa (**Fig. 31 - calle 2**), vale la pena recordar que el tamaño de las VLPs-MS2 es de 2505 kDa aproximadamente.

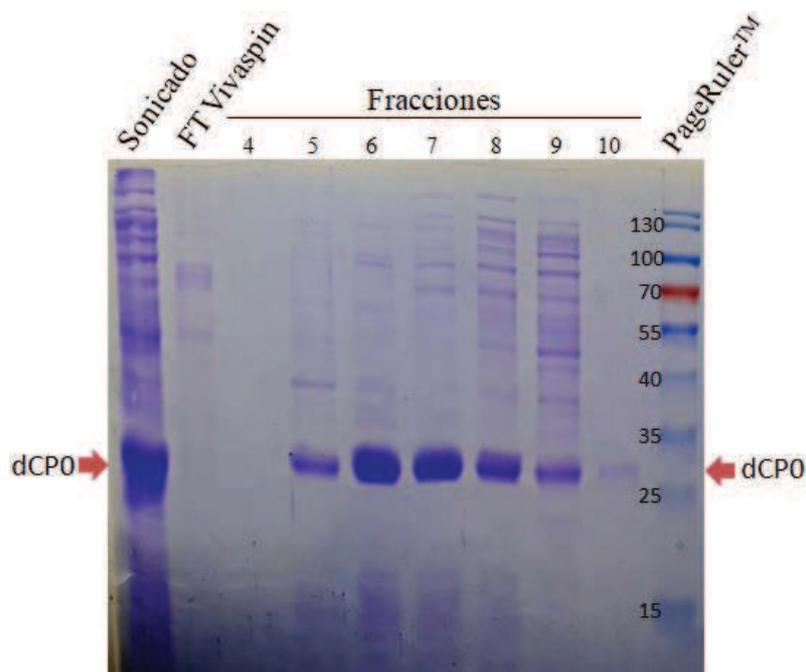


Figura 31: Purificación de VLPs mediante columna SEC. Foto representativa de SDS-PAGE con tinción coomassie donde se evalúan las fracciones obtenidas del procesamiento de dCP0-6 a partir de la separación en la columna SEC. Con una flecha roja se señala la proteína recombinante dCP0. Se observa que eluye sobre todo en las fracciones 6, 7 y 8.

Se analizaron las nanopartículas obtenidas a partir de dCP0 en la fracción 6 de la columna SEC mediante Dual Light Scattering (DLS) y mediante Microscopía Electrónica de Transferencia (MET).

Cuando se evalúan los datos del DLS por el porcentaje de masa, el 65,3 % tiene un diámetro ($36,5 \pm 4,41$ nm) similar a las VLPs de MS2 (27 nm) (**Fig. 32-A**). También se observan cúmulos proteicos de tamaño de alrededor de 250 nm que podrían quedar en la purificación mediante SEC, los cuales representan el 34,7% de la masa.

En cambio, cuando se evalúa por el número de partículas, casi la totalidad (99,9%) comprenden a las VLPs, con un diámetro de 32 nm. Como se mencionó anteriormente, este valor es similar al tamaño de las VLPs de MS2 (**Fig. 32-B**).

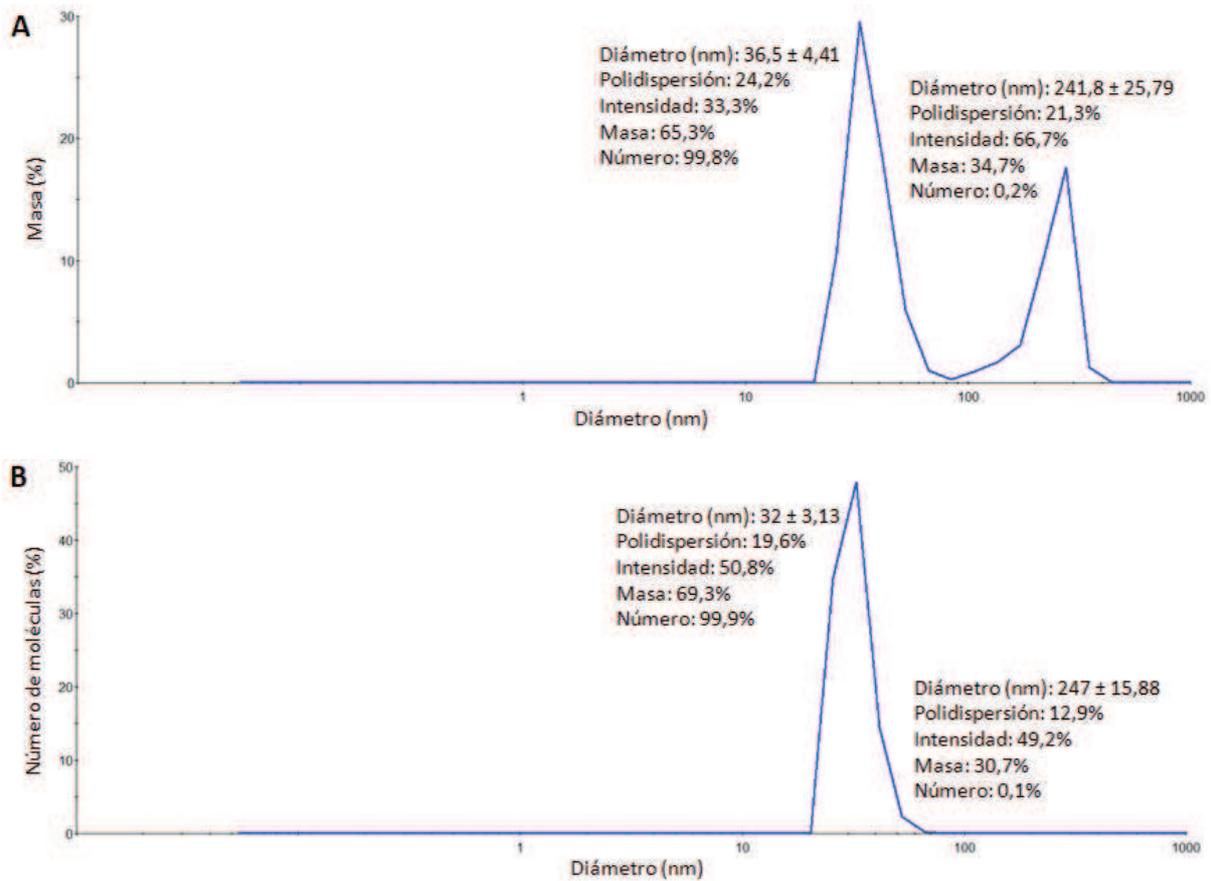


Figura 32: Diámetro de nanopartículas evaluado mediante DLS. Gráfico de distribución del diámetro de las estructuras obtenidas según A) % de masa y B) % de número de partículas. El eje X se presenta en escala logarítmica. Se analizaron los datos sin tener en cuenta las mediciones menores a 5 nm.

Cuando se evalúa la Microscopía Electrónica de Transmisión, se observa una mayoría de nanopartículas circulares que corresponderían a VLPs-MS2, y una representación más baja de estructuras de forma variable con mayor tamaño (**Fig. 33- A y B**).

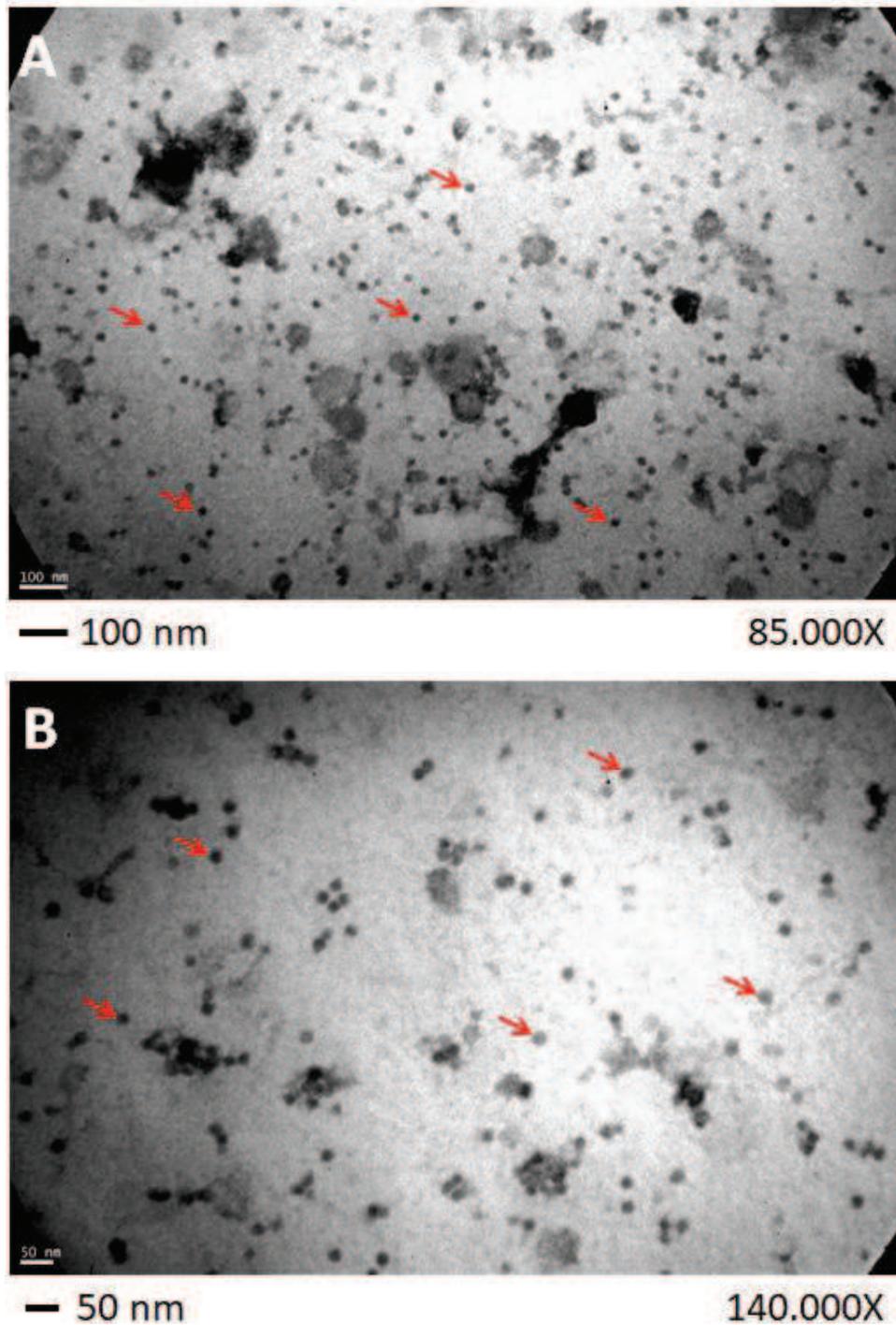


Figura 33: Nanopartículas observadas mediante MET. Imagen invertida de tinción con ácido fosfotúngstico realizadas mediante microscopía electrónica de transferencia, las flechas rojas señalan estructuras que podrían ser VLPs-MS2. La tinción con ácido fosfotúngstico tiñe los residuos de lisina y arginina. A) Aumento de 85.000X y la barra de escala es de 100 nm. B) Aumento de 140.000X y la barra de la escala es de 50 nm.

Utilizando la escala de referencia, se midió el diámetro de todas las estructuras mediante el software ImageJ (**Fig. 34- A**).

Al analizar los datos de las nanopartículas se observa una alta frecuencia de partículas de 15 a 30 nm (61,9%) con un diámetro promedio de $22,2 \pm 3,9$ nm. También se observa una baja representatividad de estructuras de mayores a 70 nm (4,3%) (**Fig. 34- B**).

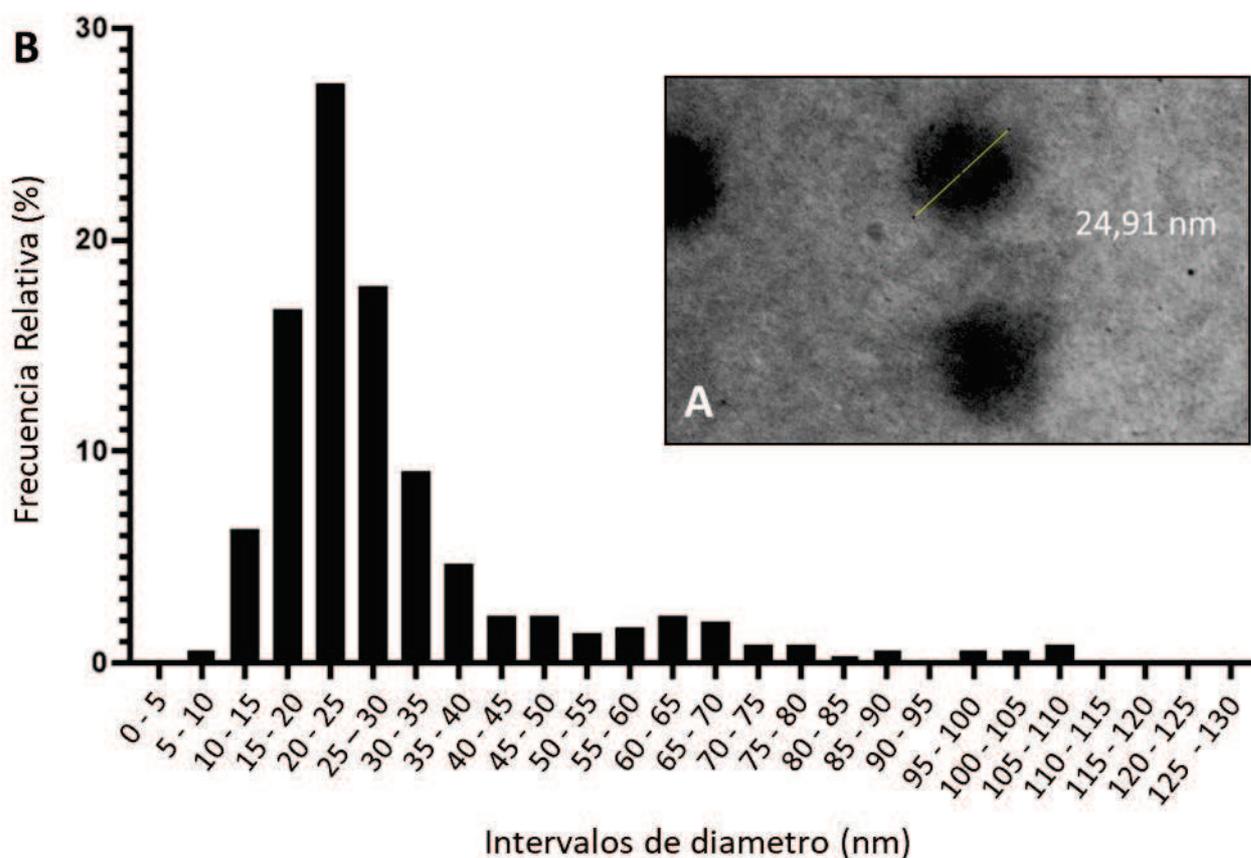


Figura 34: Histograma del diámetro de las estructuras. Se midieron las estructuras obtenidas en las imágenes de microscopía electrónica utilizando la referencia (50 o 100 nm). **A)** Representación de la medición de una nanopartícula. **B)** Histograma con las mediciones obtenidas, en el eje Y se muestra la frecuencia relativa en porcentaje ($n = 365$) de cada intervalo calculado (eje X).

Estos datos, junto con los reportados del DLS, nos permiten concluir que obtuvimos las VLPs con el tamaño esperado. A partir de esta estrategia, partiendo de un cultivo bacteriano de 50 ml, se obtuvo 1 ml de VLPs con una concentración de $0,56 \pm 0,11$ mg/ml (1 A [280 nm] = 0,83 mg/ml), con una pureza calculada del 80%.

Aunque la columna SEC es un buen método analítico para evaluación de purificación de VLPs, la producción a gran escala se dificulta por las mismas limitaciones de la técnica. Una estrategia que permite escalar la purificación de VLPs es la Filtración de Flujo Tangencial (TFF).

Filtración de Flujo Tangencial (TFF)

La ventaja de esta técnica es que, mediante recirculación, concentra estructuras de un peso molecular mayor a la membrana filtrante. Por los resultados obtenidos previamente, se procesó sólo el lisado bacteriano del clon dCP0-6. La filtración mediante la membrana de 1000 kDa, y posterior concentración mediante columna de intercambio catiónico Sartobind, permitió obtener una banda del tamaño esperado en la corrida electroforética (**Figura 35**). Los datos obtenidos indican que, bajo las condiciones de inducción, la proteína recombinante no forma cuerpos de inclusión debido a que los niveles de proteína que se encuentran en el pellet son mínimos, también se observa que las bacterias fueron eficientemente lisadas debido a que la mayoría de la proteína bacteriana se encuentra en el sobrenadante (**Fig. 35- calles 1 y 2**). Luego, observamos que la proteína recombinante dCP0 es retenida por la membrana filtrante de 1000kDa, esto indicaría que la estructura formada por estas nanopartículas es mayor a 1000 kDa (**Fig. 35- calle 4**), se observan proteínas contaminantes de mayor peso molecular que son eliminadas en los pasos posteriores. Al realizar la dilución para disminuir la fuerza iónica y permitir la unión de las VLPs a la columna de intercambio catiónico (**Fig. 35- calle 5**), observamos que parte de lo sembrado no queda retenido en la columna (**Fig. 35- calle 6**). Inicialmente se intentó eluir las VLPs con buffer NaNO 100 mM y la fuerza iónica no fue suficiente (**Fig. 35- calle 7**). Se necesitó una concentración mayor (250 mM) para eluir las VLPs de la columna (**Fig. 35- calles 8, 9 y 10**).

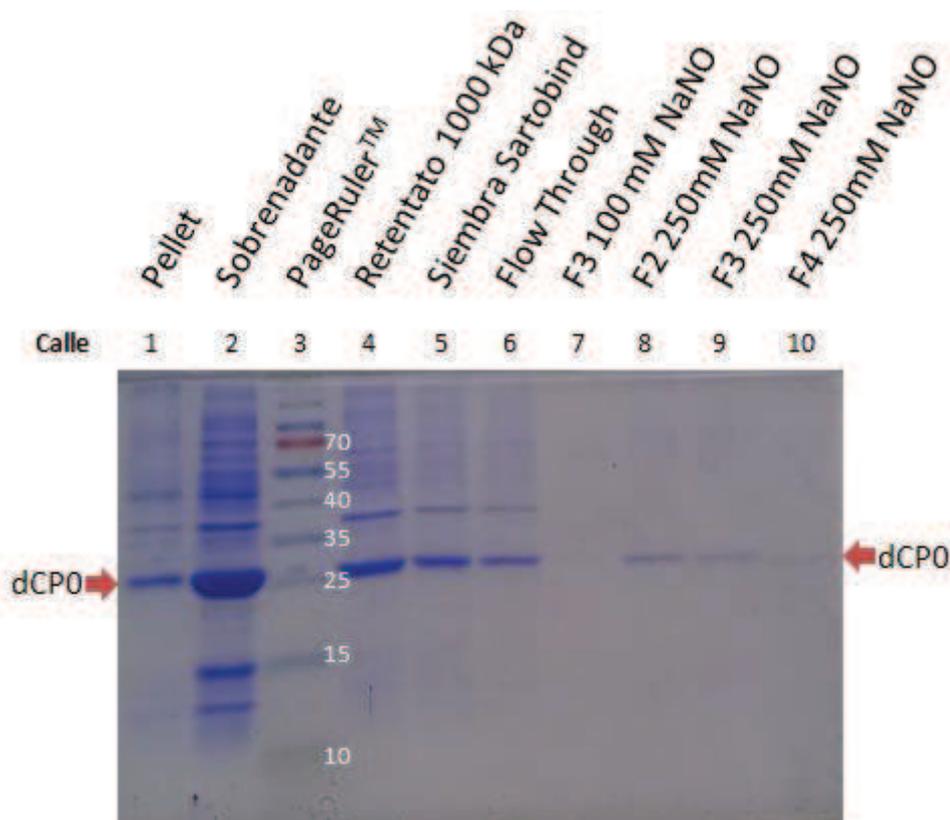


Figura 35. Purificación de VLPs mediante TFF y columna Sartobind S: Las bacterias fueron lisadas y centrifugadas. Se observa el pellet (calle 1) y el sobrenadante filtrado (calle 2). Luego se concentró mediante TFF con una membrana de 1000 kDa (calle 4). Se diluyó la muestra para ser sembrada en la columna Sartobind (calle 5), y también observamos lo que no quedó retenido en la misma (calle 6). Utilizando el buffer NaNO 100mM las VLPs no eluyen (calle 7). Aumentando la fuerza iónica (NaNO₃ 250 mM) las VLPs eluyen en las fracciones 2 y 3, y en menor medida en la fracción 4 (calle 8, 9 y 10). Con las flechas rojas se señala la proteína recombinante.

A partir de estos resultados podemos decir que la estructura purificada es mayor a 1000 kDa y estaría formada por la proteína dCP0. Sin embargo, al observar proteína recombinante en el Flow Through se procedió a analizar esta muestra mediante DLS (**Fig. 36**). Se observaron estructuras de 100-250 nm que no serían VLPs, probablemente sean cúmulos proteicos que no pudieron quedar retenidos en la columna, de hecho, se observan también proteínas no específicas en el gel que podrían formar cuerpos de inclusión con dCP0 (**Fig. 36- calle 6**).

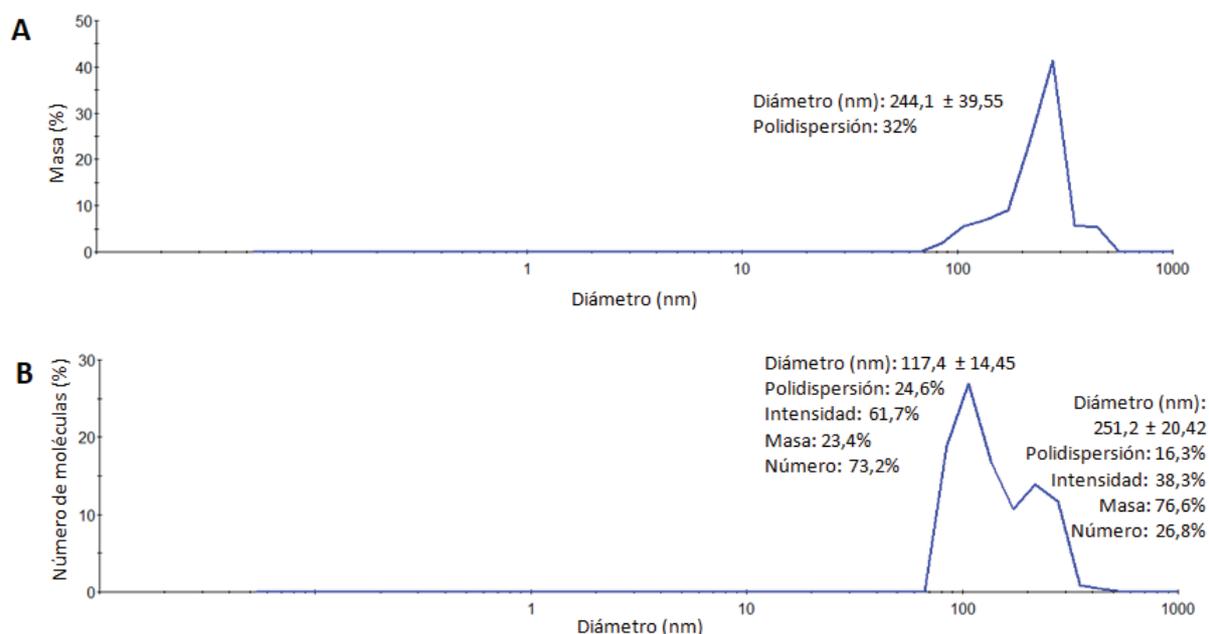


Figura 36: DLS del Flow Through de la columna Sartobind. Gráfico de distribución del diámetro de las estructuras obtenidas según % de masa (A) y % de número de partículas (B). El eje X se presenta en escala logarítmica.

Al evaluar mediante DLS la fracción 2, se observa que las mismas tienen un tamaño aproximado de 50 nm que corresponderían a las VLPs. Estas estructuras representan 1/3 de la masa (**Fig. 37-A**) y casi la totalidad de las moléculas (**Fig. 37-B**). Vale la pena destacar que en este análisis no se observaron estructuras menores a 5 nm, indicando que no habría proteínas libres.

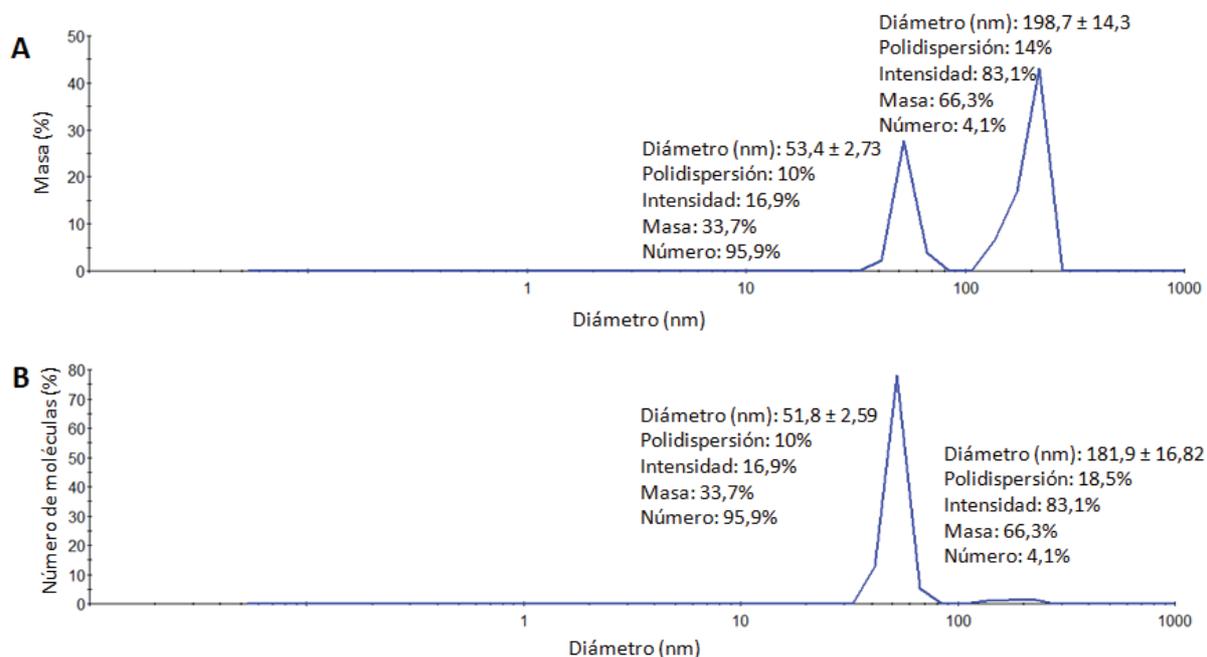


Figura 37: DLS de la Fracción 2 obtenida en Sartobind S. Gráfico de distribución del diámetro de las estructuras obtenidas según A) % de masa y B) % de número de moléculas. El eje X se presenta en escala logarítmica hasta 1000 nm.

Partiendo de 50 ml de cultivo bacteriano, mediante esta técnica se obtuvieron 0,15 mg/ml de VLPs purificadas en un volumen total de 5 ml (fracciones 2 y 3 250 mM NaNO₃), con una pureza calculada del 85%.

Con las VLPs-MS2 purificadas con el tamaño esperado se puede proceder al segundo objetivo de esta tesina, el cual consiste en ensamblar VLPs-MS2 conteniendo una molécula reportera en su interior. Brevemente, en el bacteriófago salvaje la región TR (19 nucleótidos) del ARN viral interacciona con el dímero de CP, luego se ensambla la estructura encapsulando el ARN viral. Por lo que una estrategia para encapsular cargos consiste en conjugarlos a la región TR y luego desensamblar y re-ensamblar las cápsides (mediante disminución y aumento de pH). Como prueba de concepto se buscó encapsular QDs como molécula reportera, para esto en primer lugar se les unió la región TR.

Preparación de nanoestructuras en base a QDs

En primer lugar se puso a punto un protocolo mediante activación por glutaraldehído y luego se utilizaron columnas cromatográficas para purificar los QDs de los reactivos utilizados. Inicialmente, se modificaron los QDs con una única capa de albúmina. Luego, al unir de forma covalente la secuencia de ADN de unión a la cara de interna de CP conteniendo un amino (NH-TR), los QDs perdían su fluorescencia, mientras que el control sin amino (TR), conservaba su fluorescencia pero se adhería a las paredes del tubo (datos no mostrados). A partir de estos resultados se decidió

adicionar una segunda capa de albúmina a los QDs, para aumentar su estabilidad y, además, adicionar albúmina acetilada a la incubación del TR-DNA para evitar la adherencia a la pared de polipropileno del tubo de 1,5 ml.

Las nanopartículas con la primera capa de albúmina se obtuvieron en la fracción 4 y 5 (**Fig. 38-A**), luego cuando se le adhiere la segunda se obtienen en la fracción 4 (**Fig. 38-B**). Cuando se realizó el paso de unión covalente del NH-TR y TR, aunque los QDs no perdieron la fluorescencia, se siguieron adhiriendo a la pared del tubo, aún en presencia de albúmina acetilada (datos no mostrados).

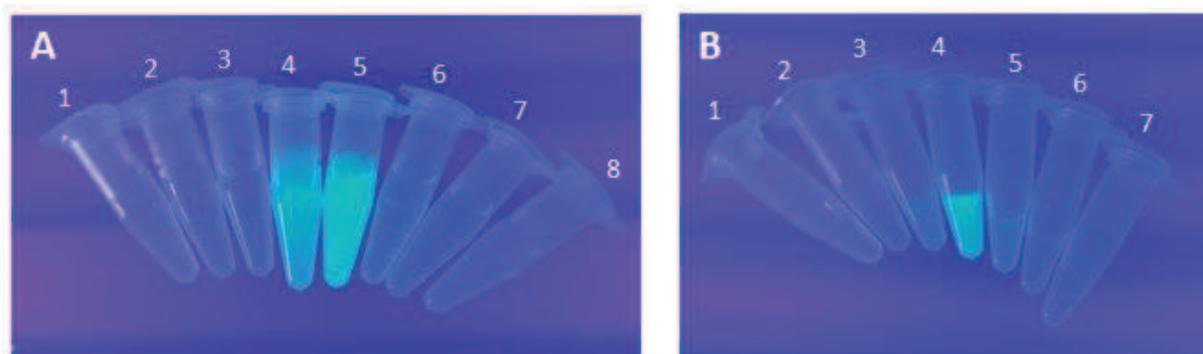


Figura 38: Purificación de QDs. Fracciones de cromatografía de exclusión molecular de QDs mediante Sefarosa CL-6B recubiertos con una sola capa de albúmina (**A**) o, mediante PD-10 con resina Sephadex G-25 con el agregado posterior de una segunda capa de albúmina (**B**).

A partir de estos resultados se decidió iniciar un nuevo protocolo de microemulsión mediante sono-química.

Brevemente, este procedimiento involucra la microemulsión de los QDs en cloroformo y metanol (fase orgánica) y la albúmina (fase acuosa) para posibilitar la cobertura de los QDs con albúmina, que permiten su solubilización en la fase acuosa. Este protocolo permite en pocos pasos obtener QDs recubiertos de albúmina reactiva para la unión covalente de las moléculas de interés que contenga un grupo amino.

Al adicionar el NH-TR a estas moléculas, se observa un aumento en la fluorescencia a 260 nm comparado con los QDs recubiertos en glicina (QD-Gly) (**Fig. 39-A**). En este caso, la absorbancia a 260 nm es similar a la obtenida por el QD-H1, que se produjo mediante la unión de un ADN de una longitud y estructura similar al TR-DNA conteniendo un amino en su extremo 5'. Este QD, conteniendo una secuencia control de ADN, permitirá evaluar la unión no específica a la cápside viral desensamblada.

Cuando se evalúa la relación 260/280, que permite cuantificar la relación entre ADN y proteínas, se observa un marcado aumento de esta proporción. Esto indica que hay presencia de moléculas de ADN en la superficie de los QDs recubiertos en albúmina (**Fig. 39-B**).

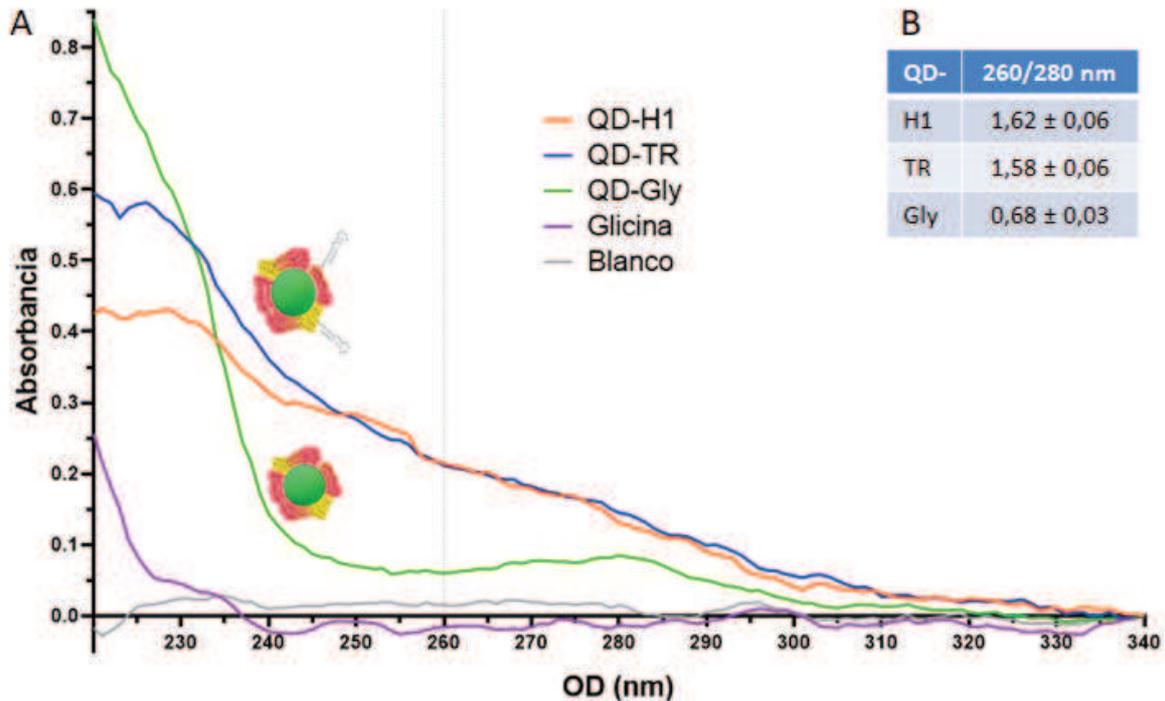


Figura 39: Análisis de absorbancia de los QDs modificados. A) Espectro de absorbancia de los QDs recubiertos con doble capa de albúmina y con unión covalente a: H1 (QD-H1), NH-TR (QD-TR), glicina (QD-Gly), y espectros de absorción de Glicina 100 mM y PBS (blanco). B) Relación 260/280 nm de los QDs recubiertos con albúmina y con unión covalente a: H1 (QD-H1), NH-TR (QD-TR) y glicina (QD-Gly).

Una vez que se determinó que los QDs recubiertos con albúmina tienen unida la región TR, se procedió a analizar el diámetro de las estructuras para evaluar si estas podrían ser encapsuladas dentro de las VLPs-MS2. Se observó que las nanopartículas tienen en promedio un diámetro de 31 nm, también se observaron en mucho menor proporción (0,05%) agregados de 150 nm aproximadamente (**Fig. 40**). Vale la pena recordar que el diámetro interno de las VLPs es de 22-23 nm, pero teniendo en cuenta la sobreestimación del DLS por medir el radio hidrodinámico se evaluará el ensamblado de esta molécula reportera dentro de MS2-VLPs.

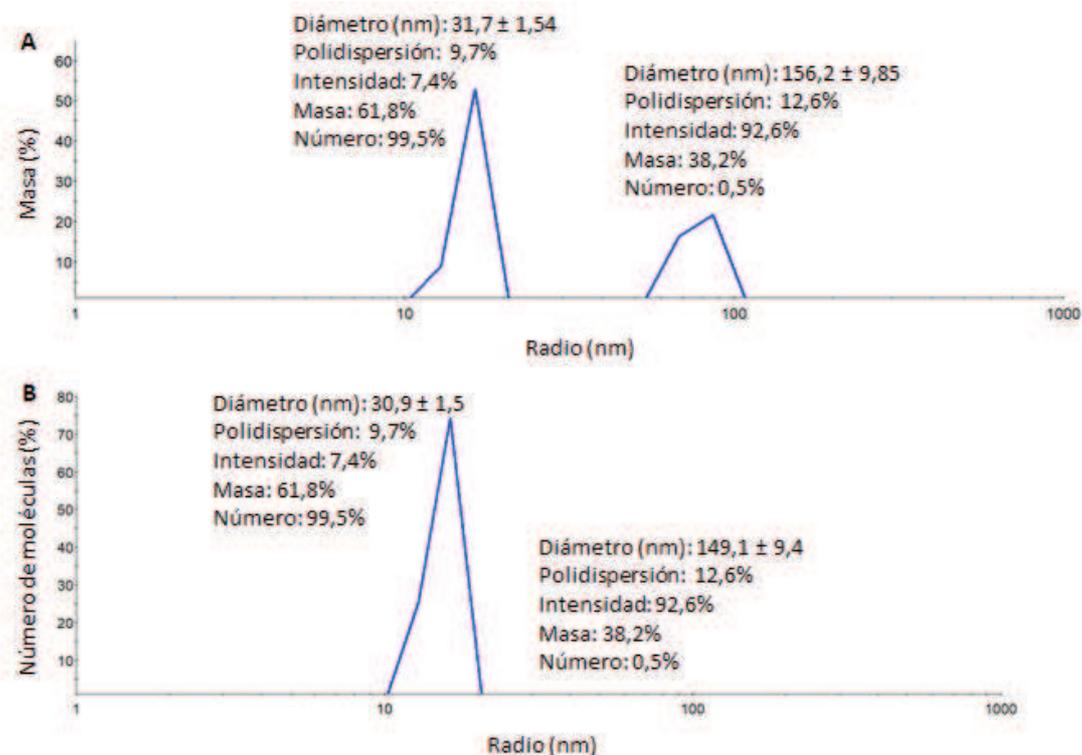


Figura 40: DLS de los QDs recubiertos con albúmina y la región TR. Gráfico de distribución del radio de las estructuras obtenidas según A) % de masa y B) % de número de partículas. El eje X se presenta en escala logarítmica hasta 1000 nm.

Con el fin de encapsular los QDs modificados con la región TR se procedió a desensamblar y re-ensamblar las VLPs-MS2 purificadas modificando el pH de la solución.

Desensamblado VLPs-MS2

El protocolo para desensamblar las VLPs involucró el uso de ácido acético glacial (2/3 Vf), de esta manera los dímeros de CP desensamblados se mantienen en solución, luego se realiza una centrifugación para sedimentar los aglomerados proteicos que puedan formarse, y el sobrenadante se utiliza para los experimentos de encapsulación.

Luego de tratar con ácido acético glacial y centrifugar, no detectamos presencia de proteína en el sobrenadante cuando medimos la absorbancia a 280 nm, mientras que en el pellet, resuspendido en PBS se observa una alta absorbancia a 280 nm (datos no mostrados). Estos datos indican que las VLPs purificadas se habrían precipitado. Se repitió 3 veces el protocolo agregando de forma más paulatina el ácido acético glacial y se obtuvo el mismo resultado. Esto podría explicarse por la presencia de contaminación con ácidos nucleicos o proteínas que conlleven a la aglomeración de las VLPs y su posterior precipitación al centrifugar. Se continuará evaluando diferentes protocolos para aumentar los niveles de pureza de las VLPs y el uso de otros protocolos para el desensamblado de las mismas.

DISCUSIÓN

Optimización de la producción de VLPs-MS2

Frente a los datos expuestos de incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón, se necesitan nuevas herramientas que permitan rápidamente desarrollar estrategias que mejoren la calidad de vida de los afectados. Una plataforma versátil para transportar cargos terapéuticos que permita la modificación de los ligandos exteriores, sería muy útil frente al desarrollo de la resistencia de las células tumorales. Las VLPs tienen un amplio potencial de aplicación, debido a que no solo se pueden usar como nanotransportadores sino también para el desarrollo de vacunas contra el cáncer de pulmón^{118,119}. Los objetivos propuestos para este trabajo implican una optimización de la expresión y del proceso de purificación de VLPs-MS2; y posteriormente, el ensamble de estas nanopartículas conteniendo una molécula reportera en su interior.

Como se mencionó, el plásmido de expresión original para la producción de VLPs-MS2 con el que contaba el laboratorio (pET21-dCP) tiene clonado río arriba del gen dCP la región codificante del T7 leader. Esta última es una secuencia de 11 aminoácidos (MASMTGGQMG) sumado a un puente aminoacídico (RGSH). El T7 leader es un péptido comúnmente añadido al extremo N-terminal de una proteína de interés para aumentar los niveles de expresión^{110,120,121}, siempre y cuando se utilice algún vector de la serie pET, los cuales se basan en un sistema de inducción de la T7 ARN polimerasa. Entonces, esta es una de las razones por la cual en un principio se insertó el tag, para aumentar la expresión de la proteína recombinante dCP.

Por otro lado, uno de los objetivos del proyecto en el cual se encuadra esta tesis es utilizar las VLPs-MS2 para desarrollar estrategias de terapia dirigida, por ejemplo, mediante la adición de un péptido a la superficie de la cápside, el cual sería reconocido por algún tipo celular específico, desencadenando un proceso de endocitosis⁷⁵. Este péptido puede estar fusionado al extremo N-terminal de dCP, por lo tanto, validar el ensamblado de las cápsides con el T7 leader permitiría suponer que la inserción de un péptido específico no dificulta el ensamblado de las cápsides. Y además, si se quisieran utilizar las VLPs-MS2 para el desarrollo de vacunas mediante inserción de péptidos antigénicos¹⁰⁶, se podrían utilizar estas VLPs como control negativo de la respuesta esperada. Fueron todas estas razones las que motivaron la inserción del T7 leader en la secuencia, pero experimentos preliminares del laboratorio, no mostrados en este trabajo, mostraron bajos niveles de inducción de la proteína recombinante. Por esta razón, en esta tesis se optó por eliminar la secuencia del T7 leader. Y en relación a esto, la estrategia de clonado planteada mediante corte con enzima de restricción y posterior religado para la obtención del pET21-dCP0 funcionó correctamente (**Fig. 24**). A continuación, se muestra un recordatorio de las construcciones plasmídicas a obtener en este trabajo (**Fig. 41**).

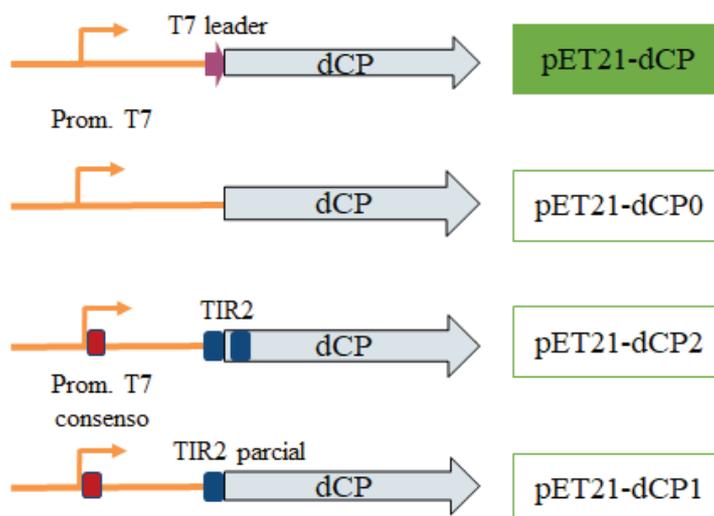


Figura 41: Esquema de plásmidos a obtener: Brevemente, se detallan las diferencias críticas entre los diferentes plásmidos. Con una flecha violeta se marca el T7 leader, el cuadrado rojo simboliza la adición de 4 bases en el promotor T7 (Prom. T7 consenso) y cada cuadrado azul simboliza las 6 bases modificadas (TIR 2).

Basados en el trabajo realizado por Shilling y colaboradores¹⁰⁹, se pudo llevar a cabo la estrategia de clonado desarrollada para incluir las secuencias T7 consenso y TIR2 con el fin de aumentar la expresión de la proteína recombinante. Esta estrategia incluyó 2 PCRs sucesivas, un clonado y un posterior corte y ligación con enzimas de restricción en el vector receptor. Mediante este abordaje se pudo obtener uno de los plásmidos que se estaban buscando, el pET21-dCP2 (**Fig. 25**). La base alternada que se observa en la secuenciación del plásmido obtenido puede deberse a un error de la Taq¹²² o también a una mutación de la bacteria¹²³. Ya que, la secuencia del cebador 2 utilizada para la amplificación es la correcta, y la secuencia templado (pET28-mSA) de la que proviene esta secuencia, posee la guanina correspondiente (dato no mostrado).

Una vez que obtuvimos los plásmidos pET21-dCP0 y pET21-dCP2, comenzamos con los experimentos de evaluación de crecimiento bacteriano y de expresión, y en paralelo continuamos haciendo los experimentos para obtener el pET21-dCP1. Sin embargo, desistimos de esta búsqueda debido a los resultados obtenidos: los elementos incluidos, promotor T7 consenso y región TIR2, no aumentaron los niveles de expresión de proteína recombinante (**Fig. 29**). Hubiese sido conveniente obtener el pET21-dCP1 en el siguiente supuesto. En primer lugar, si el plásmido que incluía las modificaciones aumentaba la expresión de la proteína recombinante; y en segundo lugar, si al evaluar el ensamblado hubiésemos observado que las VLPs no se estructuraban de la manera correcta. Podríamos inferir en ese caso que el agregado de los 2 aminoácidos después del ATG (glutamina y leucina) dificultó el correcto ensamblado de las cápsides. En esa situación hubiese sido provechoso obtener el pET21-dCP1, para evaluar si se lograba aumentar la producción de dCP y que las VLPs se puedan ensamblar correctamente.

De todas maneras, en relación a esto, existen trabajos científicos en los que agregan aminoácidos en el extremo N-terminal de dCP para el desarrollo de vacunas^{106, 124, 125}. Por ejemplo, se ha desarrollado una nueva vacuna candidata para múltiples serotipos de HPV a partir de VLPs-MS2 que ofrece una protección comparable en ratones a la vacuna ya aprobada Gardasil9¹⁰⁶. Las cápsides exponen sobre su superficie péptidos de 15 a 39 aminoácidos de la proteína menor de la cápside del HPV (L2). Los autores insertaron las secuencias mediante PCR en el extremo N-terminal del dímero de CP. Considerando que a pesar del agregado peptídico, los autores igual obtienen VLPs-MS2 ensambladas, sería poco probable que el agregado de los 2 aminoácidos (dCP2) en la estrategia planteada o el T7 leader que estaba insertado originalmente dificultara el correcto ensamblado de las nanopartículas. Sin embargo, como se detalló, no logramos purificar VLPs derivadas de dCP2, lo cual nos indicaría que el agregado de los 2 aminoácidos (glutamina y leucina) sí dificulta el ensamblado de las nanopartículas, al menos en las condiciones analizadas en este trabajo.

Considerando el trabajo mencionado donde insertan péptidos de HPV y obtienen VLPs-MS2 ensambladas, podríamos inferir que la secuencia del T7 leader que se encontraba en el plásmido original (pET21-dCP), no debería afectar la estructura de las cápsides. En esta tesis de licenciatura, el ensamblado de VLPs mediado por el plásmido original no fue analizado ya que los niveles de inducción eran bajos.

La razón por la cual no se observó un aumento en la producción de la proteína recombinante a raíz de las modificaciones realizadas podría deberse a varias razones. Una de ellas es que en el trabajo del cual deriva esta estrategia, las 3 proteínas en las cuales se optimizó la expresión tienen un tag de histidina después del ATG¹⁰⁹. Además, el plásmido de expresión de estreptavidina monomérica (pET28-mSA) utilizado en este trabajo como templado para amplificar la región conteniendo el promotor T7 consenso y la región TIR2, también tiene un tag de histidina. A pesar de que no contamos con un plásmido de expresión de mSA sin el promotor T7 y la región TIR2 para utilizar como control, es importante destacar que, se observaron cualitativamente altos niveles de expresión de mSA (datos no mostrados). La región TIR2 junto con el tag de histidina podría ser lo que aumenta la producción de las proteínas analizadas por los autores. El dímero de CP expresado en este trabajo no cuenta con un tag de histidina, podría ser el motivo por el cual no hubo un aumento en la cantidad de proteína recombinante producida. También, por otro lado, podría ser que el agregado de los 2 aminoácidos a dCP en el extremo N-terminal esté afectando la inducción o el plegado de la proteína recombinante, condicionando el rendimiento de producción.

A pesar de los resultados obtenidos en los cuales no se observó un aporte significativo en la expresión de la proteína recombinante optimizada (dCP2 vs dCP0), sería pertinente evaluar el aporte mediado únicamente por la modificación del promotor. Es decir, diseñar un plásmido similar al original, pET21-dCP, pero agregando las 4 bases

que hacen al promotor T7 consenso. Si se realizara un análisis de los niveles de ARNm mediante PCR en tiempo real, podría evaluarse si las dificultades de expresión que tiene dCP2, son a niveles de transcripción y/o traducción. Pero considerando que el objetivo final es obtener los mayores niveles de inducción de proteína recombinante, no se consideró este análisis necesario.

Suponiendo que el correcto plegado de la proteína recombinante y en consecuencia el ensamblado de las cápsides se podría ver afectado por el rápido crecimiento bacteriano a 37 °C se probaron temperaturas de cultivo menores¹¹¹. También, el crecimiento bacteriano se podría ver afectado por la rápida expresión de la proteína recombinante, disminuyendo su rendimiento por la posibilidad de que se estén formando cuerpos de inclusión. Disminuir la temperatura de crecimiento suele ser una alternativa para optimizar la producción de una proteína recombinante¹¹⁵. De hecho, en bibliografía se reportan procedimientos donde producen VLPs-MS2 a 30 °C, e incluso a 22 °C^{126,127}. Por estos motivos evaluamos el crecimiento a 28 °C y efectivamente observamos un aumento en el rendimiento de la expresión de proteína recombinante (Fig. 29). Se consideró evaluar la expresión a 22 °C pero por limitaciones de los equipos experimentales se descartó. También observamos que las modificaciones introducidas en los plásmidos no afectan el crecimiento bacteriano, tanto a 37 °C como a 28 °C.

Se logró optimizar la producción del dímero dCP, considerando que la comparación entre los niveles de expresión cuando arrancamos este trabajo son considerablemente menores a los niveles obtenidos luego del desarrollo de esta tesis de licenciatura (**Fig. 30**). Destacamos que, al eliminar la secuencia codificante del T7 leader aumentamos la expresión de la proteína recombinante. Es decir, que esa secuencia si podría afectar la producción de la proteína recombinante o el correcto ensamblado de las VLPs, y en consecuencia, podría condicionar el crecimiento bacteriano. Teniendo en cuenta los resultados podemos decir que la optimización planteada de integrar las regiones promotor T7 y región TIR2 no generó el efecto esperado. Bajo las condiciones analizadas, la delección del T7 leader y la disminución de la temperatura de inducción fueron los puntos críticos que aumentaron el rendimiento de expresión de dCP.

Purificación de VLPs-MS2

En una segunda etapa de este trabajo se desarrollaron 2 estrategias de purificación de las VLPs y se evaluó su estructura. Primero se evaluó la purificación concentrando mediante una columna Vivaspín de corte en 100 kDa y una posterior cromatografía de exclusión molecular. Este proceso se llevó a cabo bajo las condiciones de mayores niveles de expresión, se utilizó el clon dCP0-6, y se hizo la inducción a 28 °C. También se intentó purificar las VLPs mediadas por dCP2, para evaluar si, más allá de las similitudes en los niveles de expresión, podría haber diferencias en las estructuras de las VLPs, consecuencia de las modificaciones introducidas. Como se detalló previamente, estas VLPs no se lograron purificar, incluso optimizando el protocolo con

ADNasa, ARNasa y lisozima. La razón por la cual las VLPs no tienen la estructura correcta para permanecer en solución podría deberse a diversos factores. Recordemos que este vector se destaca por tener básicamente 2 diferencias con el pET21-dCP0. Se le agregaron 4 bases al promotor y se modificó la región de inicio de la traducción. Es poco probable que la modificación del promotor condicione el ensamblado de las VLPs, considerando que se observó expresión de la proteína recombinante. En principio, lo más probable, es que los 2 aminoácidos agregados a la secuencia río abajo del ATG podrían estar dificultado el correcto plegado de la proteína recombinante, y por lo tanto, el ensamblado de las VLPs. Cabe destacar que, considerando el trabajo citado previamente donde insertan péptidos de HPV en la secuencia dCP¹⁰⁶, y obtienen igual VLPs, es extraño que el agregado de 2 aminoácidos condicione la estructura de las cápsides. Por lo que consideramos que se debería continuar con la optimización del protocolo de purificación, para determinar cuáles son las condiciones necesarias para que las VLPs-MS2 formadas por dCP2 puedan ensamblarse de la manera correcta.

Mediante la estrategia de purificación planteada utilizando la columna de Sefarosa CL-6B logramos purificar VLPs-MS2 formadas por dCP0 con un nivel de pureza del 80%. No se observó proteína recombinante en el eluato de la columna Vivaspin 100KDa, lo que indicaría que no habría monómeros y/o dímeros de dCP0. Ya se han utilizado este tipo de columnas para purificar VLPs-MS2¹²⁸, y también estructuras de tamaño relativamente grandes, como vesículas extracelulares (100-200 nm)¹²⁹. El fundamento utilizado radica en la diferencia de tamaño entre las VLPs ensambladas y los dímeros de dCP, los cuales quedan retenidos y eluyen en las fracciones finales junto con el resto de las proteínas bacterianas. En nuestro trabajo, observamos que la proteína eluye principalmente en las fracciones 6 y 7, donde se observan pocas proteínas contaminantes, esto indicaría que las VLPs están ensambladas debido a que eluyen en las primeras fracciones. Vale la pena recordar que las VLPs se desnaturalizan mediante calor, un agente reductor y detergente cuando van a ser sembradas, por esta razón en el gel se observa el dímero de 27,8 kDa. También se observa dCP0 en la fracción 8 y 9, pero con proteínas de mayor tamaño contaminantes. Esto podría indicar que la proteína recombinante está formando estructuras pero no del tamaño adecuado, podrían ser dímeros, trímeros y tetrámeros de dCP0 (56 kDa, 83 kDa y 111 kDa, respectivamente) los cuales eluyen en la misma fracción que proteínas de esos tamaños.

Aunque la técnica previamente descrita permite afirmar que las estructuras supramoleculares formadas por dCP0 tienen alto peso molecular, no permiten aseverar que la estructura de las VLPs sea la deseada¹³⁰. Las nanoestructuras se pueden evaluar mediante Dynamic Light Scattering (DLS) y mediante Microscopía Electrónica de Transferencia (MET). En el análisis por DLS se observó que el diámetro de la mayoría de las nanopartículas fue cercano al esperado, tanto si consideramos la agrupación por masa como por número de partículas (**Fig. 32**). Como se mencionó previamente, el MS2 tiene una cápside icosaédrica de 27 nm de diámetro con número de triangulación $T = 3$,

este número indica la cantidad de unidades estructurales por cara del icosaedro⁷⁴. De todas maneras, se observó que, en ausencia del genoma viral, se forman cápsides $T = 3$ y en menor proporción cápsides $T = 4$ y combinaciones entre ambas. A causa de lo mencionado, se generan estructuras de entre 27 y 33 nm¹²⁶. Esta particularidad genera poblaciones heterogéneas de VLPs-MS2, lo que explicaría la polidispersión observada del 20 - 25% en el diámetro obtenido mediante el análisis por DLS (**Fig. 32**). El software considera que para que las estructuras analizadas sean homogéneas, la polidispersión debe ser menor al 15%, y si es mayor a 30%, considera que la población es polidispersa. Cabe destacar que la medición del diámetro por esta técnica no es exacta. Lo que se calcula es el radio de una esfera hipotética que difunde a la misma velocidad que las partículas medidas (radio hidrodinámico). Por lo tanto, la medición es teórica debido a que las partículas en solución están generalmente hidratadas o solvatadas^{131,132}.

Es destacable que no se observaron estructuras con diámetros mayores a los 250 nm en la purificación de VLPs-MS2, por esta razón, la escala logarítmica del eje X llega hasta 1000 nm. De todas maneras, vale la pena aclarar que para el análisis de estos gráficos se tuvo que eliminar las estructuras menores a 5 nm debido que al estar presentes en mucho mayor cantidad que las nanopartículas, no permiten apreciar la altura de los picos. Esto nos estaría indicando que no todas las proteínas recombinantes purificadas en la fracción 6 de la SEC están formando VLPs. Esto podría deberse al desensamblado de las VLPs, generando dCP0 libre, y/o proteínas bacterianas contaminantes. El proceso o las condiciones de corrida podrían estar afectando el ensamblado. También es probable que el ADN o ARN presente en el lisado bacteriano esté interfiriendo en el ensamblado de las cápsides, podrían formarse agregados de proteína-ADN/ARN, que serían las estructuras de 250 nm que detecta el DLS (**Fig. 32**). El sonicado genera fragmentos de ADN/ARN de 300 - 500 pb que pesan entre 185 - 300 kDa, es decir que permanecen cuando se utiliza la columna Vivaspin de corte de 100 kDa para concentrar. Estas moléculas podrían interferir en el proceso de purificación, debido a que por carga negativa de los fosfatos, pueden interactuar con las proteínas¹³³.

Las imágenes de microscopía electrónica no permiten definir si la estructura de la nanopartícula es la correcta, pero se observan estructuras circulares que corresponderían a las VLPs-MS2. Los datos obtenidos en el DLS y en MET correlacionan entre sí, mediante ambas técnicas se obtiene que aproximadamente el 60% - 70% de las estructuras tiene un diámetro similar a las VLPs-MS2. También, en ambas metodologías se observan estructuras de tamaño variable mayor a 70 nm. Mediante DLS se obtiene un diámetro mayor que lo medido mediante MET ($32 \pm 3,13$ nm y $22,2 \pm 3,9$ nm, respectivamente), como se reportó en otros estudios^{124,134,135}.

La estrategia de purificación concentrando las nanopartículas mediante SEC permite obtener VLPs-MS2, pero, debido a limitaciones técnicas, no se pueden procesar grandes volúmenes de lisado bacteriano. Debido a que en este proyecto se quiere contar con

grandes cantidades de VLPs-MS2, se desarrolló una segunda estrategia de purificación que pueda ser escalable, como la Filtración de Flujo Tangencial (TFF)¹³⁶ y posterior concentración mediante una columna de intercambio catiónico Sartobind¹³⁷. El TFF es ampliamente utilizado en desarrollos biotecnológicos y en la industria alimentaria, y se destaca su extensivo uso para la concentración, separación y purificación de nanopartículas¹³⁸. Esta estrategia difiere de la filtración normal en que el flujo es tangencial a la membrana filtrante, en lugar de ser perpendicular. De esta manera se evita el apelmazamiento y que se obstruyan los poros de la membrana, lo que facilita una filtración uniforme (**Fig. 42**)¹³⁹.

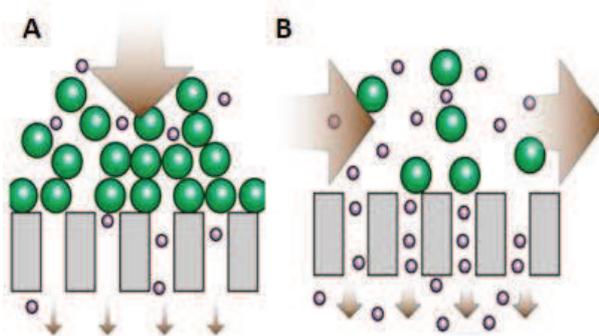


Figura 42: Esquema ilustrativo de la diferencia entre la filtración perpendicular y TFF. A) Filtración perpendicular donde las partículas se apelmazan y obstruyen los poros. B) Filtración de flujo tangencial donde la recirculación permite una adecuada filtración de las partículas pequeñas. Adaptado de Bussato, S. y colaboradores¹³⁹.

El TFF permite, mediante recirculación, concentrar moléculas que sean mayores a los poros de la membrana filtrante. En este trabajo, considerando que las VLPs-MS2 tiene un peso molecular calculado de 2505 kDa, se utilizó una membrana 1000 kDa para purificar. Este abordaje permite filtrar de la solución todo lo que sea menor a 1000 kDa, de esta manera, se eliminan las proteínas recombinantes que no estén formado VLPs, así como las proteínas bacterianas contaminantes, los restos de ADN/ARN y las sales.

Por lo mencionado anteriormente se procedió a purificar las VLPs-MS2 producidas por el clon dCP0-6. La estrategia de purificación planteada consiste primero en una filtración tangencial y luego una concentración mediante una columna de intercambio catiónico. En la primera etapa, utilizando la estrategia del TFF, se logró obtener una banda del tamaño esperado que corresponde a dCP0 (**Fig. 35- calle 4**). Se observaron proteínas contaminantes de mayor peso molecular, estas podrían estar formando agregados proteicos que no son filtrados por la membrana, en los pasos posteriores de la purificación son eliminados. Inicialmente, se observaron dificultades en el proceso de filtración por TFF, se hipotetizó que los fragmentos remanentes de ADN/ARN, consecuencia del sonicado, podrían estar interfiriendo en la membrana dificultando el proceso de filtración. Por esta razón, se trataron las muestras con ADNasa y ARNasa, y se agregó lisozima para que las bacterias sean correctamente lisadas y, una vez liberado el ácido nucleico, las enzimas puedan degradarlo más fácilmente. Con esta optimización

se logró mejorar el proceso, por lo que concluimos que, a diferencia de las moléculas de 300 - 500 pb generadas por el sonicado, parecería que los nucleótidos libres son fácilmente filtrados.

En una segunda etapa de este proceso de purificación se llevó a cabo una concentración del retentado obtenido utilizando una columna Sartobind S 3 ml. La misma, tiene una matriz de celulosa con poros $> 3 \mu\text{m}$ y grupos sulfónicos ($\text{R-CH}_2\text{-SO}_3^-$) unidos covalentemente, por lo que es un intercambiador catiónico¹⁴⁰. Estas columnas son frecuentemente utilizadas para la purificación de virus y VLPs¹⁴¹. El bacteriófago MS2 tiene una estructura compleja con múltiples cargas, se observó que a $\text{pH} = 7$ se adhiere tanto a las matrices de carga positiva como negativa¹⁴², en nuestro trabajo utilizamos un intercambiador catiónico para evitar el pegado del ADN/ARN que podrían quedar remanente, estas biomoléculas tienen carga negativa por los grupos fosfato. Verificamos que la proteína recombinante dCP0 se adhiere a la superficie negativa de la membrana utilizada, esta proteína estaría formando las VLPs-MS2. Aumentando la fuerza iónica eluimos lo que serían las partículas virales (**Fig. 35- calle 8 y 9**). Si la filtración tangencial del paso anterior fuese deficiente, podría ser dCP0 sin formar estructuras supramoleculares, considerando que el punto isoeléctrico teórico de dCP es 8,3¹²⁹, y que, en las condiciones de corrida ($\text{pH} = 7$) esta proteína tendría una carga positiva. Es necesario verificar el tamaño de las nanoestructuras mediante alguna técnica como el DLS para descartar la presencia dCP0 libre y/o VLPs no ensambladas correctamente.

Previo a comprobar el diámetro de estas nanopartículas, se analizó por DLS la fracción de lo que no quedó retenido en la columna (**Fig. 35- calle 6**), debido a que en el gel se observaba presencia de dCP0. Se observaron estructuras de 100 - 250 nm que claramente no corresponden a VLPs correctamente ensambladas, el % de polidispersión es alto (30%) indicando una población heterogénea de estructuras. Por lo verificado, aparenta ser un método adecuado para limpiar los agregados proteicos, tanto de dCP0 como de proteínas contaminantes que se observan en el gel.

Luego, se evaluó la fracción 2, donde esperamos encontrar las VLPs-MS2. Se observa que la mayoría de las estructuras tiene un diámetro de 50 nm aproximadamente, con una pequeña polidispersión del 10%, señalando una población homogénea. Estas nanopartículas tendrían un tamaño mayor al esperado para las VLPs-MS2 (27 y 33 nm, considerando las posibles estructuras $T = 3$ y $T = 4$, respectivamente). Considerando los errores asociados al DLS mencionados previamente, podríamos inferir que purificamos VLPs-MS2. Sin embargo, haría falta hacer otros análisis para verificar el diámetro de estas nanopartículas, se podría volver a medir por DLS o analizar por MET, procesos que no se pudieron llevar a cabo en este trabajo. Por otro lado, podría ser que el aumento en la fuerza iónica para eluir las VLPs de la columna Sartobind S podría estar condicionando la estabilidad y estructura de las VLPs¹²⁷. Cabe destacar que, a diferencia de las VLPs purificadas mediante SEC, donde se observaron muchos contaminantes

menores a 5 nm, mediante este método no se encontraron otras partículas que las reportadas en el DLS, indicando que en este proceso se aumentó la pureza. Estos datos nos permiten descartar la presencia de dCP0 libre.

Ambas estrategias de purificación planteadas permitieron obtener VLPs-MS2. Partiendo de 50 ml de bacterias, se obtuvo 1 ml con $0,56 \pm 0,11$ mg/ml de VLPs para el caso de SEC. Mientras que con el TFF y posterior concentración con columna de intercambio catiónico, se obtuvieron 5 ml con 0,15 mg/ml, considerando que las fracciones 2 y 3 tienen VLPs-MS2. El rendimiento de SEC se asemeja más a lo reportado en bibliografía que el rendimiento del TFF (**Tabla 8**). De todas maneras, en términos de cantidad, lo obtenido por TFF es mayor, y, además, en esta purificación no se detectaron estructuras contaminantes menores a 5 nm.

Trabajo científico	Concentración
Anobom, C. D. y col. ⁹⁶	0,5 mg/ml (VLPs)
Plevka, P. y col. ⁹⁴	0,5 – 1,0 mg/ml (VLPs o salvaje)
Patel, K. G. y col. ³²	0,4 – 0,7 mg/ml (VLPs)
Mylon, S. E. y col. ⁹⁵	0,5 – 16 mg/ml (salvaje)
Ashley, E. C. y col. ⁷⁵	10 mg/ml (salvaje)

Tabla 8: Concentración de VLPs-MS2 o MS2 reportadas en bibliografía. Se ejemplifican 5 trabajos donde se purificaron VLPs-MS2 o MS2 salvaje mediante diferentes métodos y sus respectivas concentraciones obtenidas.

Sería interesante evaluar si se puede optimizar el rendimiento obtenido por TFF y plantear los experimentos pertinentes para escalar la producción y así aumentar la producción en masa de VLPs-MS2.

Modificación de QDs y desensamblado de VLPs-MS2

Se logró obtener nanopartículas de QDs recubiertas con albúmina y con la región TR en su superficie para poder ser encapsuladas dentro de las VLPs-MS2. Además se modificaron también QDs recubiertos albumina y con H1, esta secuencia posibilitará tener un control de unión específica a la cara interna de las VLPs. Es importante destacar que podría haber unión inespecífica de albúmina a dCP, generando agregados proteicos. El QD-Gly se utilizará para evaluar la posible unión inespecífica de albúmina a las VLPs durante el re-ensamblado. Para evaluar si los QDs fueron correctamente encapsulados por las VLPs-MS2 se deberían utilizar técnicas como la microscopía electrónica de transmisión o utilizar cromatografía de afinidad utilizando dCP para retener los QDs-TR no recubiertos con VLPs-MS2.

La relación 260/280 nm obtenida para los QDs recubiertos con albúmina y ADN se encuentra en torno a 1,6, mientras que los QDs recubiertos con albúmina y glicina tienen una relación de 0,68. El aumento de la relación 260/280 nm indicaría la presencia de ADN unido de forma covalente a la superficie de los QDs de albúmina. Para

afirmar esta conclusión se debería realizar un control con la región TR sin el amino terminal para descartar una posible unión inespecífica de ADN simple cadena¹⁴³. Vale aclarar que los oligonucleótidos utilizados en este trabajo (TR y H1) forman horquillas por lo que las regiones simple cadena son muy pequeñas (1 - 4 nucleótidos), indicando que esta unión sería poco probable.

Los QDs recubiertos con albúmina y ADN obtenidos para ser encapsulados tienen un diámetro en promedio de 31 nm, como se mencionó este valor podría estar sobrestimado por la medición del DLS. También, sabiendo que el diámetro de los QDs por sí solos es de 5,5 - 6,5 nm, se podrían hacer modificaciones en el protocolo para achicar el diámetro de la cobertura, de esta manera se facilitaría el encapsulado dentro de las VLPs-MS2. Sería importante obtener QDs con una sola capa de albumina estables, ya que el diámetro promedio de estos (~10-11nm) permitiría una mayor eficiencia en el ensamblado dentro de las VLPs con respecto a los QDs obtenidos en este trabajo.

Una vez obtenidos los QDs recubiertos con la región TR para que sean encapsulados en las VLPs-MS2, se procedió a evaluar el desensamblado y re-ensamblado de las cápsides. En el presente trabajo no se pudo llevar a cabo el desensamblado de las VLPs-MS2, se formaron agregados proteicos que precipitaron. Se decidió utilizar este protocolo debido a que la mayoría de los trabajos utilizan esta estrategia para el desensamblado^{75, 76, 89, 127}. El proceso de desensamblado también serviría para liberar el ARNm de *E. coli* que podría estar dentro de las VLPs purificadas, debido a que estas moléculas interaccionan con dCP^{144, 145}. Una vez liberado el ARNm se podría utilizar la ARNasa para degradarlo. Considerando que la presencia de contaminantes podría influir en la precipitación por ácido acético, una estrategia para optimizar este protocolo sería aumentar la pureza de las VLPs-MS2.

CONCLUSIONES

- ✓ La eliminación del T7 leader del plásmido de expresión y la disminución de la temperatura de crecimiento fueron los factores críticos para aumentar la expresión de la proteína recombinante dCP.
- ✓ Las modificaciones introducidas en el plásmido de expresión, promotor T7 consenso y región TIR2, no afectaron el crecimiento bacteriano y, lo más importante, no aumentaron los niveles de expresión de proteína recombinante.
- ✓ El clon obtenido dCP0-6 crecido a 28 °C fue el que demostró los mayores niveles de inducción de proteína recombinante.
- ✓ Se desarrollaron 2 estrategias para la purificación de VLPs-MS2. La primera de ellas involucra el uso de una Cromatografía de Exclusión Molecular y la segunda de ellas, involucra una Filtración de Flujo Tangencial y una posterior concentración mediante una columna de intercambio catiónico (Sartobind S).
- ✓ Se modificaron QDs con una cobertura de albúmina y con TR-DNA para poder ser encapsulados dentro de VLPs-MS2. Se llevarán a cabo las optimizaciones necesarias para desensamblar las VLPs-MS2 eficientemente.

El trabajo realizado permitió avanzar en el desarrollo de VLPs-MS2 que puedan ser utilizadas como nanotransportadores de cargos terapéuticos. Estas nanopartículas podrían ser modificadas en su superficie exterior para ser dirigidas específicamente hacia células cancerosas. Más allá de los objetivos específicos del proyecto en los cuales se encuadra esta tesis, la plataforma en desarrollo tiene un potencial de aplicación inmenso, tanto en el campo de la salud humana, como en la salud animal y otros desarrollos bio-nanotecnológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Library, S.P. *Bacteriophage MS2 capsid protein*. Disponible en: <https://www.sciencephoto.com/media/471076/view/bacteriophage-ms2-capsid-protein>.
2. Center for Disease Control and Prevention. *What Is Lung Cancer?* 2021. Acceso 12/04/2021; Disponible en: https://www.cdc.gov/cancer/lung/basic_info/what-is-lung-cancer.htm.
3. Global Cancer Observatory. *Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2020, worldwide, both sexes, all ages*. 2020. Acceso 12/07/2021; Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-multi-bars>.
4. Lu, T., et al., *Trends in the incidence, treatment, and survival of patients with lung cancer in the last four decades*. *Cancer Manag Res*, 2019. **11**: p. 943-953.
5. Siegel, R.L., et al., *Cancer statistics, 2022*. *CA Cancer J Clin*, 2022. **72**(1): p. 7-33.
6. Global Cancer Observatory. *Cancer today - Estimated number of new cases in 2020, Argentina, both sexes, all ages*. 2021. Acceso 03/05/2021; Disponible en: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2020&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=32&key=asr&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1.
7. Instituto Nacional del Cancer, A. *Estadísticas - Mortalidad 2019*. Acceso 07/07/2021; Disponible en: <https://www.argentina.gob.ar/salud/instituto-nacional-del-cancer/estadisticas/mortalidad>.
8. Allemani, C., et al., *Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries*. *Lancet* (London, England), 2018. **391**(10125): p. 1023-1075.
9. Global Cancer Observatory. *Cancer Tomorrow - Estimated number of deaths from 2020 to 2040, Males & Females, age [0-85+] Trachea, bronchus and lung*. 2021. Acceso 14/07/2021; Disponible en: https://gco.iarc.fr/tomorrow/en/dataviz/trends?types=1&sexes=1_2&mode=cancer&group_populations=0&multiple_populations=0&multiple_cancers=1&cancers=15&populations=32.
10. Zappa, C. and S.A. Mousa, *Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances*. *J Translational Lung Cancer Research*, 2016. **5**(3): p. 288-300.
11. American Cancer Society. *Non-Small Cell Lung Cancer Stages*. Acceso 07/08/2021; Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/detection-diagnosis-staging/staging-nscl.html>.
12. Lemjabbar-Alaoui, H., et al., *Lung cancer: Biology and treatment options*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1856**(2): p. 189-210.
13. Ruiz-Cordero, R. and W.P. Devine, *Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy in Lung Cancer*. *Surg Pathol Clin*, 2020. **13**(1): p. 17-33.
14. Koulouris, A., et al., *Resistance to TKIs in EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: From Mechanisms to New Therapeutic Strategies*. *Cancers* (Basel), 2022. **14**(14).
15. Wang, M., R.S. Herbst, and C. Boshoff, *Toward personalized treatment approaches for non-small-cell lung cancer*. *Nat Med*, 2021. **27**(8): p. 1345-1356.
16. Intelligence, M. *BIOPHARMACEUTICALS MARKET - GROWTH, TRENDS, COVID-19 IMPACT, AND FORECASTS (2022 - 2027)*. Acceso 08/07/2021; Disponible en: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/global-biopharmaceuticals-market-industry>.

17. Silva, A.C., et al., *Delivery Systems for Biopharmaceuticals. Part I: Nanoparticles and Microparticles*. Curr Pharm Biotechnol, 2015. **16**(11): p. 940-54.
18. Mitragotri, S., P.A. Burke, and R. Langer, *Overcoming the challenges in administering biopharmaceuticals: formulation and delivery strategies*. Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(9): p. 655-72.
19. Jain, K.K., *An Overview of Drug Delivery Systems*. Methods Mol Biol, 2020. **2059**: p. 1-54.
20. Zeb, A., et al., *Potential and Applications of Nanocarriers for Efficient Delivery of Biopharmaceuticals*. 2020. **12**(12): p. 1184.
21. Mishra, B., B.B. Patel, and S. Tiwari, *Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery*. Nanomedicine, 2010. **6**(1): p. 9-24.
22. Toy, R. and K. Roy, *Engineering nanoparticles to overcome barriers to immunotherapy*. Bioeng Transl Med, 2016. **1**(1): p. 47-62.
23. Kandasamy, G. and D. Maity, *Multifunctional theranostic nanoparticles for biomedical cancer treatments - A comprehensive review*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2021. **127**: p. 112199.
24. Yildiz, I., S. Shukla, and N.F. Steinmetz, *Applications of viral nanoparticles in medicine*. Curr Opin Biotechnol, 2011. **22**(6): p. 901-8.
25. Lei, X., X. Cai, and Y. Yang, *Genetic engineering strategies for construction of multivalent chimeric VLPs vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2020. **19**(3): p. 235-246.
26. Goh, Z.H., et al., *Virus-like particles of Macrobacterium rosenbergii nodavirus produced in bacteria*. J Virol Methods, 2011. **175**(1): p. 74-9.
27. Sasagawa, T., et al., *Synthesis and assembly of virus-like particles of human papillomaviruses type 6 and type 16 in fission yeast Schizosaccharomyces pombe*. Virology, 1995. **206**(1): p. 126-35.
28. Wang, C., et al., *MERS-CoV virus-like particles produced in insect cells induce specific humoral and cellular immunity in rhesus macaques*. Oncotarget, 2017. **8**(8): p. 12686-12694.
29. Buffin, S., et al., *Influenza A and B virus-like particles produced in mammalian cells are highly immunogenic and induce functional antibodies*. Vaccine, 2019. **37**(46): p. 6857-6867.
30. D'Aoust, M.A., et al., *The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza*. Plant Biotechnol J, 2010. **8**(5): p. 607-19.
31. Colant, N., et al., *Escherichia Coli-Based Cell-Free Protein Synthesis for Iterative Design of Tandem-Core Virus-Like Particles*. Vaccines (Basel), 2021. **9**(3).
32. Patel, K.G. and J.R. Swartz, *Surface functionalization of virus-like particles by direct conjugation using azide-alkyne click chemistry*. Bioconjug Chem, 2011. **22**(3): p. 376-87.
33. Nooraei, S., et al., *Virus-like particles: preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers*. Journal of Nanobiotechnology, 2021. **19**(1): p. 59.
34. Hill, B.D., et al., *Engineering Virus-like Particles for Antigen and Drug Delivery*. Curr Protein Pept Sci, 2018. **19**(1): p. 112-127.
35. Finbloom, J.A., et al., *Evaluation of Three Morphologically Distinct Virus-Like Particles as Nanocarriers for Convection-Enhanced Drug Delivery to Glioblastoma*. Nanomaterials (Basel), 2018. **8**(12).
36. Kaczmarczyk, S.J., et al., *Protein delivery using engineered virus-like particles*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(41): p. 16998-7003.
37. Ni, R., R. Feng, and Y. Chau, *Synthetic Approaches for Nucleic Acid Delivery: Choosing the Right Carriers*. Life (Basel), 2019. **9**(3).
38. Zeltins, A., *Construction and characterization of virus-like particles: a review*. Mol Biotechnol, 2013. **53**(1): p. 92-107.

39. Mohsen, M.O., et al., *Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines*. *Semin Immunol*, 2017. **34**: p. 123-132.
40. Caldeira, J.C., et al., *Virus-Like Particles as an Immunogenic Platform for Cancer Vaccines*. *Viruses*, 2020. **12**(5).
41. Kushnir, N., S.J. Streatfield, and V. Yusibov, *Virus-like particles as a highly efficient vaccine platform: diversity of targets and production systems and advances in clinical development*. *Vaccine*, 2012. **31**(1): p. 58-83.
42. Bachmann, M.F. and M.R. Dyer, *Therapeutic vaccination for chronic diseases: a new class of drugs in sight*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(1): p. 81-8.
43. Administration, U.S.F.a.D. *Gardasil*. Acceso 11/09/2021; Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/gardasil>.
44. Administration, U.S.F.a.D. *Gardasil9*. Acceso 11/09/2021; Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/gardasil-9>.
45. Administration, U.S.F.a.D. *Cervarix*. Acceso 11/09/2021; Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/cervarix>.
46. Administration, U.S.F.a.D. *Prehevbrio*. Acceso 11/02/2022; Disponible en: <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/prehevbrio>.
47. Agency, E.M. *Mosquirix*. Acceso 11/09/2022; Disponible en: <https://www.ema.europa.eu/en/opinion-medicine-use-outside-EU/human/mosquirix>.
48. Hager, K.J., et al., *Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine*. *N Engl J Med*, 2022. **386**(22): p. 2084-2096.
49. Gonzalez-Dominguez, I., et al., *Quantification of the HIV-1 virus-like particle production process by super-resolution imaging: From VLP budding to nanoparticle analysis*. *Biotechnol Bioeng*, 2020. **117**(7): p. 1929-1945.
50. Neukirch, L., et al., *Adenovirus based virus-like-vaccines targeting endogenous retroviruses can eliminate growing colorectal cancers in mice*. *Oncotarget*, 2019. **10**(14): p. 1458-1472.
51. Joe, C.C.D., et al., *Glycoengineered hepatitis B virus-like particles with enhanced immunogenicity*. *Vaccine*, 2020. **38**(22): p. 3892-3901.
52. Chua, B.Y., et al., *Hepatitis C VLPs delivered to dendritic cells by a TLR2 targeting lipopeptide results in enhanced antibody and cell-mediated responses*. *PLoS One*, 2012. **7**(10): p. e47492.
53. Pan, Y., et al., *Development of a microRNA delivery system based on bacteriophage MS2 virus-like particles*. *FEBS J*, 2012. **279**(7): p. 1198-208.
54. Yan, D., et al., *The application of virus-like particles as vaccines and biological vehicles*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015. **99**(24): p. 10415-32.
55. Jeong, H. and B.L. Seong, *Exploiting virus-like particles as innovative vaccines against emerging viral infections*. *J Microbiol*, 2017. **55**(3): p. 220-230.
56. Kang, S.M., M.C. Kim, and R.W. Compans, *Virus-like particles as universal influenza vaccines*. *Expert Rev Vaccines*, 2012. **11**(8): p. 995-1007.
57. Zlotnick, A. and S. Mukhopadhyay, *Virus assembly, allostery and antivirals*. *Trends Microbiol*, 2011. **19**(1): p. 14-23.
58. Bazan, S.B., et al., *Expression and characterization of HPV-16 L1 capsid protein in Pichia pastoris*. *Arch Virol*, 2009. **154**(10): p. 1609-17.
59. Bang, H.B., et al., *High-Level Production of Human Papillomavirus (HPV) Type 16 L1 in Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2016. **26**(2): p. 356-63.

60. Bundy, B.C. and J.R. Swartz, *Efficient disulfide bond formation in virus-like particles*. J Biotechnol, 2011. **154**(4): p. 230-9.
61. Scotti, N. and E.P. Rybicki, *Virus-like particles produced in plants as potential vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(2): p. 211-24.
62. Rodriguez-Limas, W.A., et al., *Molecular and process design for rotavirus-like particle production in Saccharomyces cerevisiae*. Microb Cell Fact, 2011. **10**: p. 33.
63. Palomares, L.A., J.A. Mena, and O.T. Ramirez, *Simultaneous expression of recombinant proteins in the insect cell-baculovirus system: production of virus-like particles*. Methods, 2012. **56**(3): p. 389-95.
64. Lee, Y.N., et al., *AS04-adjuvanted virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains of influenza virus confer improved protection*. Vaccine, 2014. **32**(35): p. 4578-4585.
65. Acuna, R., et al., *Hantavirus Gn and Gc glycoproteins self-assemble into virus-like particles*. J Virol, 2014. **88**(4): p. 2344-8.
66. Bellier, B. and D. Klatzmann, *Virus-like particle-based vaccines against hepatitis C virus infection*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(2): p. 143-54.
67. Ho, Y., et al., *Assembly of human severe acute respiratory syndrome coronavirus-like particles*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **318**(4): p. 833-8.
68. Whitacre, D.C., B.O. Lee, and D.R. Milich, *Use of hepadnavirus core proteins as vaccine platforms*. Expert Rev Vaccines, 2009. **8**(11): p. 1565-73.
69. Saunders, K., F. Sainsbury, and G.P. Lomonosoff, *Efficient generation of cowpea mosaic virus empty virus-like particles by the proteolytic processing of precursors in insect cells and plants*. Virology, 2009. **393**(2): p. 329-37.
70. McGrath, M., et al., *Development of human papillomavirus chimaeric L1/L2 candidate vaccines*. Arch Virol, 2013. **158**(10): p. 2079-88.
71. Guo, H.C., et al., *Foot-and-mouth disease virus-like particles produced by a SUMO fusion protein system in Escherichia coli induce potent protective immune responses in guinea pigs, swine and cattle*. Vet Res, 2013. **44**: p. 48.
72. Vieira, H.L., et al., *Triple layered rotavirus VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production*. J Biotechnol, 2005. **120**(1): p. 72-82.
73. Fu, Y. and J. Li, *A novel delivery platform based on Bacteriophage MS2 virus-like particles*. Virus Res, 2016. **211**: p. 9-16.
74. Golmohammadi, R., et al., *The refined structure of bacteriophage MS2 at 2.8 Å resolution*. J Mol Biol, 1993. **234**(3): p. 620-39.
75. Ashley, C.E., et al., *Cell-specific delivery of diverse cargos by bacteriophage MS2 virus-like particles*. ACS Nano, 2011. **5**(7): p. 5729-45.
76. Galaway, F.A. and P.G. Stockley, *MS2 viruslike particles: a robust, semisynthetic targeted drug delivery platform*. Mol Pharm, 2013. **10**(1): p. 59-68.
77. Bank, P.D. *T=3 MS2 Virus-like particle*. Acceso 03/02/2022; Disponible en: <https://www.rcsb.org/3d-view/6RRS>.
78. Zhang, J., et al., *Delivery of microRNA-21-sponge and pre-microRNA-122 by MS2 virus-like particles to therapeutically target hepatocellular carcinoma cells*. Exp Biol Med (Maywood), 2021. **246**(23): p. 2463-2472.
79. ElSohly, A.M., et al., *Synthetically Modified Viral Capsids as Versatile Carriers for Use in Antibody-Based Cell Targeting*. Bioconjug Chem, 2015. **26**(8): p. 1590-6.

80. Wang, G., et al., *Immunogenicity evaluation of MS2 phage-mediated chimeric nanoparticle displaying an immunodominant B cell epitope of foot-and-mouth disease virus*. PeerJ, 2018. **6**: p. e4823.
81. Li, J., et al., *Messenger RNA vaccine based on recombinant MS2 virus-like particles against prostate cancer*. Int J Cancer, 2014. **134**(7): p. 1683-94.
82. Yadav, R., et al., *Mixed Bacteriophage MS2-L2 VLPs Elicit Long-Lasting Protective Antibodies against HPV Pseudovirus 51*. Viruses, 2021. **13**(6).
83. Parvez, M.K., *Geometric architecture of viruses*. World J Virol, 2020. **9**(2): p. 5-18.
84. NCBI. *phage MS2 genome*. Acceso 08/02/2022; Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/NC_001417.2?report=graph.
85. de Smit, M.H. and J. van Duin, *Translational initiation at the coat-protein gene of phage MS2: native upstream RNA relieves inhibition by local secondary structure*. Mol Microbiol, 1993. **9**(5): p. 1079-88.
86. Borodavka, A., R. Tuma, and P.G. Stockley, *Evidence that viral RNAs have evolved for efficient, two-stage packaging*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(39): p. 15769-74.
87. Rolfsson, O., et al., *Mutually-induced conformational switching of RNA and coat protein underpins efficient assembly of a viral capsid*. J Mol Biol, 2010. **401**(2): p. 309-322.
88. Valegard, K., et al., *The three-dimensional structure of the bacterial virus MS2*. Nature, 1990. **345**(6270): p. 36-41.
89. Basnak, G., et al., *Viral genomic single-stranded RNA directs the pathway toward a T=3 capsid*. J Mol Biol, 2010. **395**(5): p. 924-36.
90. Peabody, D.S. and F. Lim, *Complementation of RNA binding site mutations in MS2 coat protein heterodimers*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(12): p. 2352-9.
91. Lalwani Prakash, D. and S. Gosavi, *Understanding the Folding Mediated Assembly of the Bacteriophage MS2 Coat Protein Dimers*. J Phys Chem B, 2021. **125**(31): p. 8722-8732.
92. Mikel, P., P. Vasickova, and P. Kralik, *One-plasmid double-expression His-tag system for rapid production and easy purification of MS2 phage-like particles*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 17501.
93. Legendre, D. and J. Fastrez, *Production in Saccharomyces cerevisiae of MS2 virus-like particles packaging functional heterologous mRNAs*. J Biotechnol, 2005. **117**(2): p. 183-94.
94. Plevka, P., K. Tars, and L. Liljas, *Structure and stability of icosahedral particles of a covalent coat protein dimer of bacteriophage MS2*. Protein Sci, 2009. **18**(8): p. 1653-61.
95. Mylon, S.E., et al., *Influence of salts and natural organic matter on the stability of bacteriophage MS2*. Langmuir, 2010. **26**(2): p. 1035-42.
96. Anobom, C.D., et al., *Structural studies of MS2 bacteriophage virus particle disassembly by nuclear magnetic resonance relaxation measurements*. Biophys J, 2003. **84**(6): p. 3894-903.
97. Zhang, L., et al., *A novel method to produce armored double-stranded DNA by encapsulation of MS2 viral capsids*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2015. **99**(17): p. 7047-7057.
98. Sun, S., et al., *A new RNA vaccine platform based on MS2 virus-like particles produced in Saccharomyces cerevisiae*. Biochem Biophys Res Commun, 2011. **407**(1): p. 124-8.
99. Janitzek, C.M., et al., *A proof-of-concept study for the design of a VLP-based combinatorial HPV and placental malaria vaccine*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 5260.
100. Pan, Y., et al., *A Therapeutic Peptide Vaccine Against PCSK9*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 12534.
101. Querido, E. and P. Chartrand, *Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells*. Methods Cell Biol, 2008. **85**: p. 273-92.

102. Beld, M., et al., *Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control*. J Clin Microbiol, 2004. **42**(7): p. 3059-64.
103. Chackerian, B., et al., *Peptide epitope identification by affinity selection on bacteriophage MS2 virus-like particles*. J Mol Biol, 2011. **409**(2): p. 225-37.
104. Ulmer, J.B., et al., *RNA-based vaccines*. Vaccine, 2012. **30**(30): p. 4414-8.
105. Mockey, M., et al., *mRNA-based cancer vaccine: prevention of B16 melanoma progression and metastasis by systemic injection of MART1 mRNA histidylated lipopolyplexes*. Cancer Gene Ther, 2007. **14**(9): p. 802-14.
106. Zhai, L., et al., *A novel candidate HPV vaccine: MS2 phage VLP displaying a tandem HPV L2 peptide offers similar protection in mice to Gardasil-9*. Antiviral Res, 2017. **147**: p. 116-123.
107. Yao, Y., et al., *Using a novel microRNA delivery system to inhibit osteoclastogenesis*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(4): p. 8337-50.
108. Labrou, N.E., *Protein purification: an overview*. Methods Mol Biol, 2014. **1129**: p. 3-10.
109. Shilling, P.J., et al., *Improved designs for pET expression plasmids increase protein production yield in Escherichia coli*. Commun Biol, 2020. **3**(1): p. 214.
110. Wu, Z., *Techniques for labelling biological macromolecules for spectroscopic studies*. 2019.
111. Hannig, G. and S.C. Makrides, *Strategies for optimizing heterologous protein expression in Escherichia coli*. Trends Biotechnol, 1998. **16**(2): p. 54-60.
112. Kargozar, S., et al., *Quantum Dots: A Review from Concept to Clinic*. Biotechnol J, 2020. **15**(12): p. e2000117.
113. Kokorina, A.A., T.S. Ponomaryova, and I.Y. Goryacheva, *Photoluminescence-based immunochemical methods for determination of C-reactive protein and procalcitonin*. Talanta, 2021. **224**: p. 121837.
114. Studier, F.W. and B.A. Moffatt, *Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes*. J Mol Biol, 1986. **189**(1): p. 113-30.
115. Francis, D.M. and R. Page, *Strategies to optimize protein expression in E. coli*. Curr Protoc Protein Sci, 2010. **Chapter 5**: p. Unit 5 24 1-29.
116. New England Biolabs. *Protein Data Access* 12/2021; Disponible en: <https://international.neb.com/tools-and-resources/usage-guidelines/protein-data>.
117. Hoog, J.L., et al., *Ultrastructural investigation methods for Trypanosoma brucei*. Methods Cell Biol, 2010. **96**: p. 175-96.
118. Ong, H.K., W.S. Tan, and K.L. Ho, *Virus like particles as a platform for cancer vaccine development*. PeerJ, 2017. **5**: p. e4053.
119. Ungaro, F., et al., *VLPs and particle strategies for cancer vaccines*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(10): p. 1173-93.
120. Heilshorn, S.C., et al., *Endothelial cell adhesion to the fibronectin CS5 domain in artificial extracellular matrix proteins*. Biomaterials, 2003. **24**(23): p. 4245-52.
121. Mierendorf, R.C., et al., *Expression and Purification of Recombinant Proteins Using the pET System*. Methods Mol Med, 1998. **13**: p. 257-92.
122. McInerney, P., P. Adams, and M.Z. Hadi, *Error Rate Comparison during Polymerase Chain Reaction by DNA Polymerase*. Mol Biol Int, 2014. **2014**: p. 287430.
123. Rosenberg, S.M., *Evolving responsively: adaptive mutation*. Nat Rev Genet, 2001. **2**(7): p. 504-15.
124. Chiba, S., et al., *Multivalent nanoparticle-based vaccines protect hamsters against SARS-CoV-2 after a single immunization*. Commun Biol, 2021. **4**(1): p. 597.

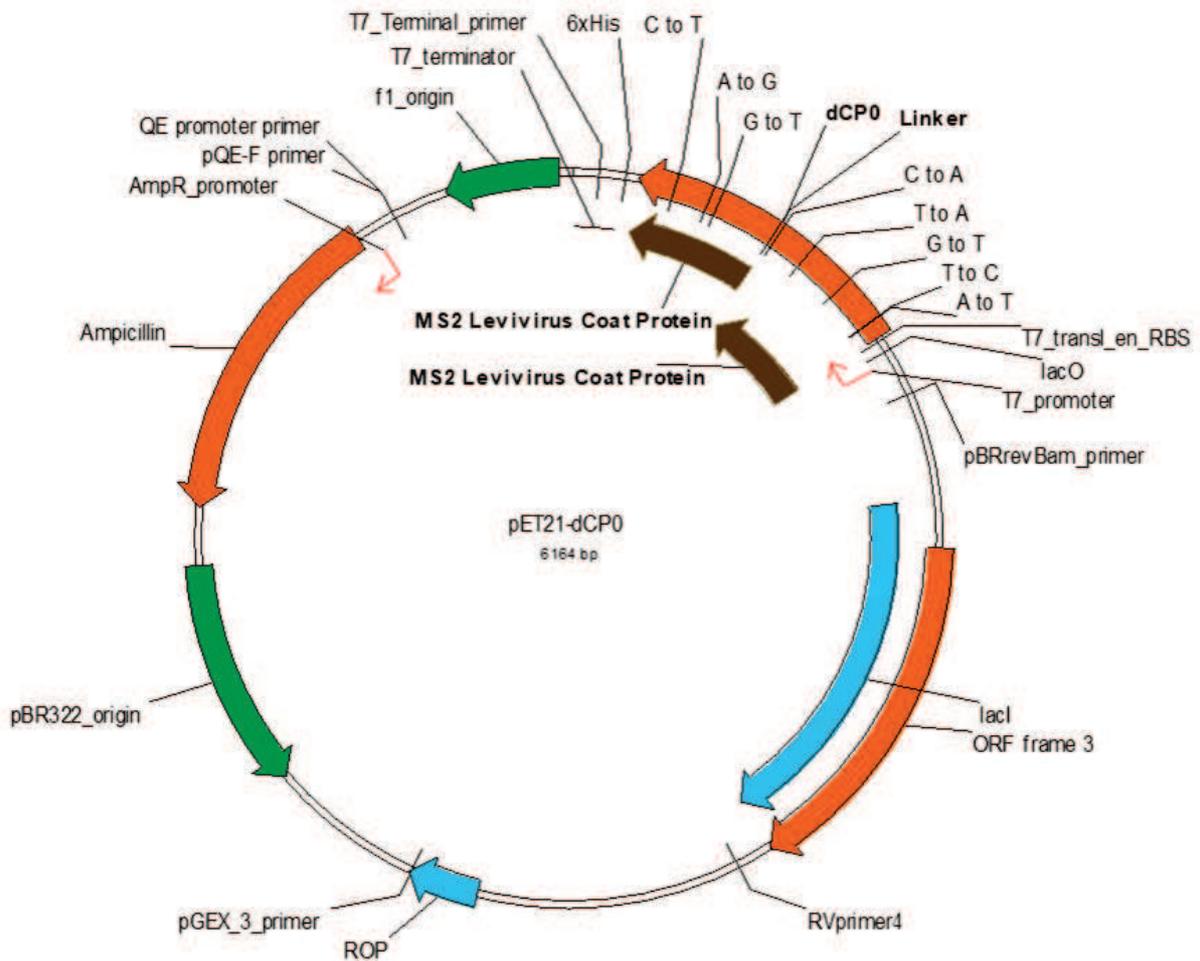
125. Dong, Y.M., et al., *Promising MS2 mediated virus-like particle vaccine against foot-and-mouth disease*. Antiviral Res, 2015. **117**: p. 39-43.
126. de Martin Garrido, N., et al., *Bacteriophage MS2 displays unreported capsid variability assembling T = 4 and mixed capsids*. Mol Microbiol, 2020. **113**(1): p. 143-152.
127. Hashemi, K., et al., *Optimizing the synthesis and purification of MS2 virus like particles*. Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 19851.
128. Peabody, D.S., *Translational repression by bacteriophage MS2 coat protein expressed from a plasmid. A system for genetic analysis of a protein-RNA interaction*. J Biol Chem, 1990. **265**(10): p. 5684-9.
129. Krusic Alic, V., et al., *Extracellular Vesicles from Human Cerebrospinal Fluid Are Effectively Separated by Sepharose CL-6B-Comparison of Four Gravity-Flow Size Exclusion Chromatography Methods*. Biomedicines, 2022. **10**(4).
130. Garmann, R.F., A.M. Goldfain, and V.N. Manoharan, *Measurements of the self-assembly kinetics of individual viral capsids around their RNA genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2019. **116**(45): p. 22485-22490.
131. Bhattacharjee, S., *DLS and zeta potential - What they are and what they are not?* J Control Release, 2016. **235**: p. 337-351.
132. Hawe, A., et al., *Taylor dispersion analysis compared to dynamic light scattering for the size analysis of therapeutic peptides and proteins and their aggregates*. Pharm Res, 2011. **28**(9): p. 2302-10.
133. Berthold, W. and J. Walter, *Protein purification: aspects of processes for pharmaceutical products*. Biologicals, 1994. **22**(2): p. 135-50.
134. Pabisch, S., et al., *Effect of interparticle interactions on size determination of zirconia and silica based systems – A comparison of SAXS, DLS, BET, XRD and TEM*. Chem Phys Lett, 2012. **521**(C): p. 91-97.
135. T. G. F. Souza et al 2016 J. Phys.: Conf. Ser. 733 012039.
136. Gagnon, P., *Technology trends in antibody purification*. J Chromatogr A, 2012. **1221**: p. 57-70.
137. Stein, D., V. Thom, and J. Hubbuch, *High throughput screening setup of a scale-down device for membrane chromatography-aggregate removal of monoclonal antibodies*. Biotechnol Prog, 2020. **36**(6): p. e3055.
138. Musumeci, T., et al., *Tangential Flow Filtration Technique: An Overview on Nanomedicine Applications*. Pharm Nanotechnol, 2018. **6**(1): p. 48-60.
139. Busatto, S., et al., *Tangential Flow Filtration for Highly Efficient Concentration of Extracellular Vesicles from Large Volumes of Fluid*. Cells, 2018. **7**(12).
140. Juadjur, A. and P. Winterhalter, *Development of a novel adsorptive membrane chromatographic method for the fractionation of polyphenols from bilberry*. J Agric Food Chem, 2012. **60**(10): p. 2427-33.
141. Junter, G.A. and L. Lebrun, *Polysaccharide-based chromatographic adsorbents for virus purification and viral clearance*. J Pharm Anal, 2020. **10**(4): p. 291-312.
142. Dika, C., et al., *Isoelectric point is an inadequate descriptor of MS2, Phi X 174 and PRD1 phages adhesion on abiotic surfaces*. J Colloid Interface Sci, 2015. **446**: p. 327-34.
143. Alinovskaya, L.I., et al., *How human serum albumin recognizes DNA and RNA*. Biol Chem, 2018. **399**(4): p. 347-360.
144. Shtatland, T., et al., *Interactions of Escherichia coli RNA with bacteriophage MS2 coat protein: genomic SELEX*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(21): p. E93.
145. Toropova, K., et al., *The three-dimensional structure of genomic RNA in bacteriophage MS2: implications for assembly*. J Mol Biol, 2008. **375**(3): p. 824-36.

ABREVIATURAS

%P/V (porcentaje peso en volumen)
aa (aminoácidos)
ADN (ácido desoxirribonucleico)
APS (amonio peroxodisulfato)
ARN (ácido ribonucleico)
ARNasa (ribonucleasa A)
ARNm (ARN mensajero)
CaCl₂ (cloruro de calcio)
CFPS (síntesis proteica libre de células)
CP (proteína de la cápside)
EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético)
EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico)
HCl (ácido clorhídrico)
h (horas)
HPV (Virus del Papiloma Humano)
IPTG (isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido)
kPa (kilopascal)
LB (Luria-Bertani)
mA (miliamperio)
miARN (micro ARNs)
min (minutos)
NaCl (cloruro de sodio)
NaNO₃ (Nitrato de sodio)
NaOH (hidróxido de sodio)
NEB (New England Biolabs)
nm (nanómetro)
NSCLC (Non Small Cell Lung Carcinoma; Cáncer de pulmón de células no pequeñas)
OD_{600nm} (Densidad Óptica a 600 nm)
PCR (reacción en cadena de la polimerasa)
QDs (Quantum Dots)
SARS (Síndrome respiratorio agudo grave)
SDS (dodecilsulfato sódico)
SEC (cromatografía de exclusión por tamaño molecular)
siARN (ARNs de interferencia pequeños)
TB (Terrific Broth)
TEMED (Tetrametiletilendiamina)
TFF (cromatografía de filtración tangencial de flujo)
TIR (región de inicio de la traducción)
Tris (trisaminometano)
VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana)
VLPs (*Virus Like Particles*)
VLPs-MS2 (VLPs del bacteriófago MS2)

ANEXO

Mapa plásmido pET21-dCP0



Secuencia vector pET21-dCP0

Formato Genbank (.gb)

```

LOCUS       pET21-dCP0                6164 bp    DNA    circular    8-APR-2022
SOURCE
  ORGANISM
COMMENT     This file is created by Vector NTI
            http://www.invitrogen.com/
FEATURES             Location/Qualifiers
     misc_feature    complement(565..570)
                    /vntifkey="21"
                    /label=Linker
     V_region        complement(175..564)
                    /vntifkey="45"
                    /label=MS2\Levivirus\Coat\Protein
  
```

```

variation      complement (274..274)
                /vntifkey="96"
                /label=C\to\T
variation      complement (370..370)
                /vntifkey="96"
                /label=A\to\G
variation      complement (397..397)
                /vntifkey="96"
                /label=G\to\T
variation      complement (576..576)
                /vntifkey="96"
                /label=C\to\A
variation      complement (670..670)
                /vntifkey="96"
                /label=T\to\A
variation      complement (793..793)
                /vntifkey="96"
                /label=G\to\T
variation      complement (916..916)
                /vntifkey="96"
                /label=A\to\T
variation      complement (913..913)
                /vntifkey="96"
                /label=T\to\C
terminator     complement (1..129)
                /vntifkey="43"
                /label=T7_terminator
misc_feature   69..87
                /vntifkey="21"
                /label=T7_Terminal_primer
misc_feature   complement (140..157)
                /vntifkey="21"
                /label=6xHis
misc_feature   complement (969..985)
                /vntifkey="21"
                /label=T7_transl_en_RBS
misc_feature   complement (1003..1030)
                /vntifkey="21"
                /label=lacO
promoter       complement (1030..1048)
                /vntifkey="30"
                /label=T7_promoter
primer_bind    complement (1132..1151)
                /vntifkey="28"

```

```

/label=pBRrevBam_primer
gene      complement(1080..1343)
          /gene="tet(564-300)"
          /vntifkey="60"
misc_feature 1426..2517
          /vntifkey="21"
          /label=lacI
CDS        1558..2517
          /vntifkey="4"
          /label=ORF\frame\3
gene      complement(2576..2851)
          /gene="tet(852-576)"
          /vntifkey="60"
misc_feature 3326..3517
          /vntifkey="21"
          /label=ROP
primer_bind complement(3511..3533)
          /vntifkey="28"
          /label=pGEX_3_primer
rep_origin complement(3932..4551)
          /vntifkey="33"
          /label=pBR322_origin
CDS        complement(4706..5566)
          /gene="Ampicillin"
          /vntifkey="4"
          /label=Ampicillin
          /note="ORF frame 1"
gene      complement(4706..5566)
          /gene="Ampicillin"
          /vntifkey="60"
promoter   complement(5608..5636)
          /vntifkey="30"
          /label=AmpR_promoter
rep_origin complement(5830..6136)
          /vntifkey="33"
          /label=f1_origin
primer_bind complement(2616..2616)
          /vntifkey="28"
          /label=RVprimer4
primer_bind 5681..5681
          /vntifkey="28"
          /label=QE\promoter\primer
primer_bind 5680..5680
          /vntifkey="28"

```

```

                /label=pQE-F\primer
CDS             complement(175..960)
                /vntifkey="4"
                /label=dCP0
V_region        complement(571..960)
                /vntifkey="45"
                /label=MS2\Levivivirus\Coat\Protein
BASE COUNT     1464 a      1607 c      1636 g      1457 t
ORIGIN
    1 atccggatat agttcctcct ttcagcaaaa aaccctcaa gaccggtta gaggcccaa
   61 ggggttatgc tagttattgc tcagcgggtg cagcagcaa ctcagcttc tttcgggctt
  121 tgttagcagc cggatctcag tggtggtggt ggtggtgctc gagtgcggcc gttagtagat
  181 gccggagttt gctgcgattg ctgagggaat cgggtttcca tcttttagga gaccttgcac
  241 tgccttaaca ataagctcgc agtcggaatt cgtagcgaat attggaatgg ttagtccat
  301 atttaagtac gaacgccatg cggctacagg aagctctaca ccaccaacag tctgggttgc
  361 cactttaggc acctcgactt tgatggtgta ttgctgattc tgcgcagagc tctgacgaac
  421 gctacaggtt actttgtaag cctgtgaacg cgagttagag ctgatccatt cagcgacccc
  481 gtttagcgaag ttgcttgggg cgacagtcac gtcgccagtt ccgccattgt cgacgagaac
  541 gaactgagta aagttagaag ccattgcgcc gtagatgccg gagtttctctg cgattgctga
  601 gggaaatcggg tttccatctt ttaggagacc ttgcattgcc ttaacaataa gctcgcagtc
  661 ggaattcgtt gcgaaaattg gaatggttag ttccatattt aagtacgaac gccatcgggc
  721 tacaggaagc tctacaccac caacagctctg ggttgccact ttaggcacct cgactttgat
  781 ggtgtatttg cgattctgcg cagagctctg acgaacgcta caggttactt tgtaagcctg
  841 tgaacgcgag ttagagctga tccattcagc gaccccgta gcgaagtgc ttggggcgac
  901 agtcacgtcg ccggtaccgc cattgtcgac gagaacgaac tgagtaaagt tagaagccat
  961 atgtatatct ccttcttaaa gttaaacaaa attatctcta gaggggaatt gttatccgct
 1021 cacaattccc ctatagttag tcgatattaat ttcgcgggat cgagatctcg atcctctacg
 1081 ccggacgcat cgtggccggc atcaccggcg ccacaggtag ggttgctggc gcctatatacg
 1141 ccgacatcac cgatgggaa gatcgggctc gccacttcgg gctcatgagc gcttgttctg
 1201 gcgtgggtat ggtggcaggc cccgtggcgg ggggactggt gggcgccatc tccttgcatg
 1261 caccattcct tgcggcggcg gtgctcaacg gcctcaacct actactgggc tgcttcctaa
 1321 tgcaggagtc gcataaggga gagcgtcgag atcccggaca ccatcgatg gcgcaaaacc
 1381 tttcgggta tggcatgata gcgcccggaa gagagtcaat tcagggtggt gaatgtgaaa
 1441 ccagtaacgt tatacgaagt cgcagagat gccgggtgtct ctatcagac cgtttccgct
 1501 gtggtgaacc aggcagcca cgtttctgcg aaaacgcggg aaaaagtgga agcggcgatg
 1561 gcggagctga attacattcc caaccgctg gcacaacaac tggcgggcaa acagtcgctg
 1621 ctgattggcg ttgccacctc cagtctggcc ctgcacgcgc cgtcgcaaa t tgcgcggcg
 1681 attaaatctc gcgccgatca actgggtgcc agcgtggtgg tgcgatggt agaacgaagc
 1741 ggcgtcgaag cctgtaaagc ggcggtgcac aatcttctcg cgcaacgcgt cagtgggctg
 1801 atcattaact atccgctgga tgaccaggat gccattgctg tggaaactgc ctgcactaat
 1861 gttccggcgt tatttcttga tgtctctgac cagacacca tcaacagtat tatttctctc
 1921 catgaagacg gtacgcgact gggcgtggag catctggtcg cattgggtca ccagcaaatc
 1981 gcgctgttag cgggcccatt aagttctgct tcggcgcgct tgcgtctggc tggctggcat
 2041 aaatatctca ctcgcaatca aattcagcgc atagcggaac gggaaggcga ctggagtgcc

```

2101 atgtccggtt ttcaacaac catgcaaag ctgaatgagg gcatcgttcc cactgcatg
 2161 ctggttgcca acgatcagat ggcgctgggc gcaatgcgcg ccattaccga gtcgggctg
 2221 cgcgttggtg cggatatctc ggtagtggga tacgacgata ccgaagacag ctcatgttat
 2281 atccgcgct taaccacat caaacaggat ttctgcctgc tggggcaaac cagcgtggac
 2341 cgcttgctgc aactctctca gggccagcg gtgaaggca atcagctgtt gccctctca
 2401 ctggtgaaaa gaaaaccac cctggcgccc aatacgaaa ccgcctctcc ccgctggtg
 2461 gccgattcat taatgcagct ggcacgacag gttcccgcac tggaaagcgg gcagtgaagc
 2521 caacgcaatt aatgtaagt agctcactca ttaggcaccg ggatctcgac cgaatgccct
 2581 gagagccttc aaccagtc aactcctccg gtggcgcgcg ggcatgacta tcgctgcgcg
 2641 acttatgact gtctcttcta tcatgcaact cgtaggacag gtgcgcgag cgctctgggt
 2701 cattttcggc gaggaccgct tctgctggag cgcgacgatg atcggcctgt cgcttgccgt
 2761 attcggaaac ttgcacgcc tgcctcaagc ctctgctact ggtcccgcc ccaaacgttt
 2821 cggcgagaag caggccatta tgcggcgat ggccgccc cgggtgcgca tgatcgtgct
 2881 cctgctggtg aggaccggc taggctggcg gggttgctt actggttagc agaatgaatc
 2941 accgatcgc gagcgaacgt gaagcgactg ctgctgcaaa acgctcgca cctgagcaac
 3001 aacatgaatg gtcttcggt tccgtgttcc gtaaaagtctg gaaacgcgga agtcagcgcc
 3061 ctgcaccatt atgtccgga tctgcatcgc aggatgctgc tggctaccct gtggaacacc
 3121 tacatctgta ttaacgaagc gctggcatg accctgagtg atttttctct ggtcccggc
 3181 catccatacc gccagttgtt taccctcaca acgctccagt aaccgggat gttcatcacc
 3241 agtaaccctg atcgtgagca tctctctcgc ttccatcggg atcattacc ccatgaacag
 3301 aaatccccct tacacggagg catcagtgac caaacaggaa aaaaccgcc ttaacatggc
 3361 ccgctttatc agaagccaga cattaacgct tctggagaaa ctcaacgagc tggacgcgga
 3421 tgaacaggca gacatctgtg aatcgcttca cgaccacgct gatgagcttt accgcagctg
 3481 cctcgcgctg ttcggtgatg acggtgaaaa cctctgacac atgcagctcc cggagacggt
 3541 cacagcttgt ctgtaagcgg atgccgggag cagacaagcc cgtcagggcg cgtcagcggg
 3601 tgttggcggg tgcggggcg cagccatgac ccagtcaagt agcgatagcg gagtgatac
 3661 tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgaccatat atgcggtgtg
 3721 aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc gcttccctgc
 3781 tcaactgactc gctgcgctcg gctgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct cactcaaagg
 3841 cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg tgagcaaaag
 3901 gccagcaaaa ggcaggaac cgtaaaaagg ccgcttgct ggctttttc catagctcc
 3961 gccccctga cgagcatcac aaaaatcgac gctcaagtca gaggtgcgga aaccgacag
 4021 gactataaag ataccaggcg tttccccctg gaagctccct cgtgcgctct cctgttcga
 4081 ccctgcgctg taccggatac ctgtccgctt ttctccctc gggaagcgtg gcgcttctc
 4141 atagctcacg ctgtaggatc ctcaagtccg tgtaggctgt tcgctccaag ctgggctgtg
 4201 tgcaacgaac ccccgctcag cccgaccgct gcgcttacc cggtaactat cgtctgagt
 4261 ccaaccgctg aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac aggatagca
 4321 gagcagggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac tacggctaca
 4381 ctagaaggac agtatctggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc ggaaaaagag
 4441 ttggtagctc ttgatccggc aaaaaacca ccgctggtag cgggtggttt tttgtttgca
 4501 agcagcagat tacgcgaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc ttttctacgg
 4561 ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggtcatg agattatcaa
 4621 aaaggatctt cacctagatc cttttaaatt aaaaatgaag ttttaaatca atctaaagta
 4681 tatatgagta aacttggctc gacagttacc aatgcttaat cagtgaaggca cctatctcag

```

4741 cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc cgtcgtgtag ataactacga
4801 tacgggaggg cttaccatct ggccccagtg ctgcaatgat accgcgagac ccacgctcac
4861 cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag ggccgagcgc agaagtggtc
4921 ctgcaacttt atccgcctcc atccagteta ttaattgttg ccgggaagct agagttaagta
4981 gttcgccagt taatagtttg cgcacagtgt ttgccattgc tgcaggcatc gtgggtgtcac
5041 gctcgtcgtt tggatggct tcattcagct ccggttccca acgatcaagg cgagttaacat
5101 gatcccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gtccttcggt tcctccgatc gttgtcagaa
5161 gtaagttggc cgcagtgtta tcaactcatg ttatggcagc actgcataat tctcttactg
5221 tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctgggtgagta ctcaaccaag tcattctgag
5281 aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gccggcgcgc aatacgggat aataccgcgc
5341 cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg ttcttcgggg cgaaaactct
5401 caaggatctt accgctggtg agatccagtt cgatgtaacc cactcgtgca cccaactgat
5461 cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc aaaaacagga aggcaaatg
5521 ccgcaaaaaa gggaataagg gcgacacgga aatggtgaa actcactactc ttccttttc
5581 aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta
5641 tttagaaaaa taacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg ccacctgaaa
5701 ttgtaaacgt taatattttg ttaaaattcg cgttaaattt ttgttaaatc agctcatttt
5761 ttaaccaata ggccgaaatc ggcaaatcc ctataaatc aaaagaatag accgagatag
5821 ggttgagtgt tgttccagt tgaacaaga gtccactatt aaagaacgtg gactccaacg
5881 tcaaagggcg aaaaaccgtc tatcagggcg atggccact acgtgaacca tcaccctaat
5941 caagtttttt ggggtcgagg tgcgtaaaag cactaaatcg gaaccctaaa gggagcccc
6001 gatttagagc ttgacgggga aagccggcga acgtggcgag aaaggaaggg aagaaagcga
6061 aaggagcggg cgctagggcg ctggcaagt tagcgggtcac gctgcgcgta accaccacac
6121 ccgccgcgct taatgcgccc ctacagggcg cgtcccattc gcca

```

//

Secuencia aminoacídica de dCP0

En verde se resalta el primer monómero, y en naranja el segundo, unidos por un linker (GA).

MASNFTQFVLVDNNGTGDVTVA PSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTC SVRQSSA QNRKYTIK
VEVPKVATQTVGGVELPVA AAWRSYLNMELTIP I FATNSDCELI VKAMQGLLKDGNP I P S A I A
ANSGIYG**A**MASNFTQFVLVDNNGTGDVTVA PSNFANGVAEWISSNSRSQAYKVTC SVRQSSA
QNRKYTIKVEVPKVATQTVGGVELPVA AAWRSYLNMELTIP I FATNSDCELI VKAMQGLLKDG
NP I P S A I A ANSGIY

Peso molecular dCP0

27,83 kDa

Estimado mediante https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html

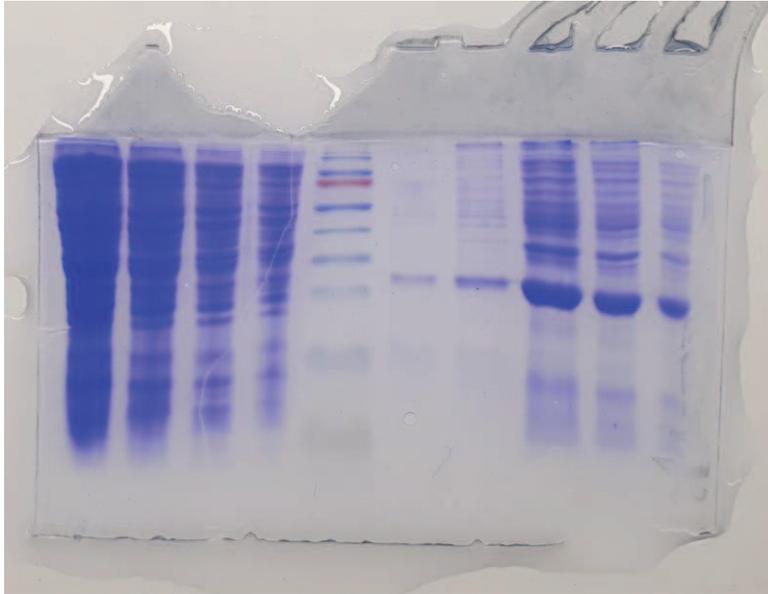
The Sequence Manipulation Suite: Protein Molecular Weight

Results for 262 residue sequence "sample sequence" starting "MASNFTQFVL".
The protein weighs 27.83 kilodaltons

Peso molecular VLPs-MS2 teórico

Considerando 90 subunidades del dímero dCP0 forman una VLP, las nanopartículas pesan 2504,7 kDa \approx 2505 kDa (90 x 27,83 kDa).

SDS-PAGE original Figura 30



Este documento es la versión final de la Tesis de Licenciatura.



Juan Cruz Noriega

05/10/2022



05/10/2022