



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Ciencias Biológicas - Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

**Desarrollo y caracterización de un candidato vacunal  
recombinante contra Hantavirus basado en las  
glicoproteínas de superficie del virus Andes**

Tesis para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas  
Área Biología Celular y Molecular

MARÍA FRANCISCA STARCK MÉNDEZ  
CONCEPCION-CHILE  
2020

Profesor Guía: Dr. Oliberto Sánchez Ramos  
Dpto. de Farmacología, Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción en conjunto con el Centro de Biotecnología y Biomedicina Spa.**

**Profesor tutor:**

---

**Dr. Oliberto Sánchez  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción**

**Comisión Evaluadora:**

---

**Dr. Ángel Oñate  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción**



---

**Dr. Gustavo Moraga  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción**

---

**Dra. Mónica Imarai  
Facultad de Química y Biología  
Universidad de Santiago de Chile**

**Directora de Programa (S)**

---

**Dra. Marcela Torrejón  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción**

*Para Ximena y Carlos, que me han dado todo.*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar unas (no tan) breves líneas a agradecer a todos quienes hicieron posible la realización de esta tesis. Sé que es probable que algunas personas queden en el tintero, pero siempre agradeceré con todo mi corazón a quienes me permitieron cumplir esta etapa.

En primer lugar a mi tutor, Dr. Oliberto Sánchez. Sin su guía, apoyo y confianza no hubiese sido posible concluir (ni siquiera empezar) este proyecto. Gracias por su paciencia y ánimo tantas veces que incluso a mí me faltó, y por ser tanto más que un tutor, un guía y un amigo.

Agradezco a mi comisión de tesis, Dra. Mónica Imarai, Dr. Ángel Oñate, Dr. Gustavo Moraga y Dra. Marcela Torrejón. Muchas gracias por su paciencia, atención y tiempo invertido tanto en la revisión del escrito de tesis como en la defensa. También por todas sus sugerencias y correcciones, así como el impulsarme a siempre mejorar.

Asimismo agradezco a todos quienes han formado y forman parte del Laboratorio de Biofármacos Recombinantes. Gracias por tantas sugerencias y apoyo en experimentos, correcciones y sobre todo por el aliento y buenos momentos. Aprovecho de agradecer a tantos miembros del Departamento de Fisiopatología, en particular del Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos, tanto profesores como estudiantes e investigadores que me ayudaron y guiaron en esta tesis.

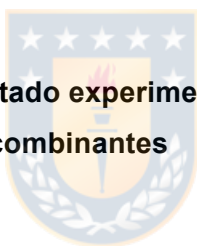
A mi familia, tanto de sangre como de corazón. Mis papás y hermanos, quienes me han apoyado y ayudado sin importar qué, durante toda mi vida. Gracias por su amor incondicional. A mis suegros y nuera, por su preocupación y afecto. A mis amigas y amigos, por su cariño, compañía y preocupación, ayudándome tanto en los buenos y, especialmente, en los malos momentos.

Sobre todo, a mi familia más cercana, mi Luis. Por sostenerme, apoyarme, ayudarme y darme tanto amor. Por estar ahí siempre.

Finalmente, agradezco el apoyo económico que permitió la realización de esta tesis. A la beca de Doctorado Nacional de CONICYT y a los proyectos I+D Aplicada en Empresas 17IDAE-74735 “Desarrollo de un candidato vacunal recombinante contra Hantavirus basado en las glicoproteínas de superficie de virus Andes” y Valorización de la Investigación en la Universidad VIU17E0087 “Desarrollo de un candidato vacunal contra Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus”.

## ÍNDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>2</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
1.1. Hantavirus	3
1.1.1. Características moleculares	3
1.1.2. Ciclo replicativo	7
1.1.3. Transmisión y distribución	12
1.2. Virus Andes	12
1.3. Tratamientos contra hantavirus	13
1.4. Desarrollo de vacunas	14
1.4.1. Estrategias para el desarrollo de antígenos	14
1.4.2. Adyuvantes	16
1.4.3. Vías de administración	17
1.5. Vacunas contra SCPH	17
1.5.1. Vacunas contra SCPH en estado experimental	18
1.6. Producción de proteínas recombinantes	20
1.7. Propuesta de investigación	22
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b>	<b>23</b>
<b>OBJETIVOS DEL TRABAJO</b>	<b>24</b>
Objetivo General	24
Objetivos Específicos	24
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>25</b>
2.1. Materiales	25
2.1.1. Medios de cultivo	25
2.1.1.1. Medios de cultivo de bacterias	25
2.1.1.2. Medios de cultivo de levaduras	26
2.1.1.3. Medios de cultivo de células de mamíferos	26
2.1.2. Antibióticos	27
2.1.3. Células	27
2.1.3.1. Cepas Bacterianas	27
2.1.3.2. Levaduras	28
2.1.3.3. Líneas de células de mamíferos	28



2.1.4. Plásmidos	28
2.1.5. Enzimas de restricción y modificación	31
2.1.6. Anticuerpos	31
2.1.7. Animales de experimentación	32
2.1.8. Extracción y purificación de ADN	32
2.1.8.1. Extracción y purificación de ADN plasmídico de bacterias	32
2.1.8.2. Extracción y purificación de ADN total de levaduras	32
2.1.9. <i>Dot Blot</i> de ADN	33
2.1.10. Electroforesis de ADN	33
2.1.11. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes	33
2.1.12. <i>Dot Blot</i> de proteínas y <i>Western blot</i>	34
2.1.13. Extracción y solubilización de proteínas	34
2.1.14. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)	36
2.1.15. Replegado y concentración de proteínas	38
2.1.16. Inmunización de animales	38
2.1.17. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)	39
2.1.18. Inmunofluorescencia	39
2.1.19. Kits comerciales	40
2.2. Métodos	41
2.2.1. Métodos generales de manipulación de bacterias	41
2.2.1.1. Preparación de bacterias electrocompetentes	41
2.2.1.2. Transformación de bacterias por electroporación	41
2.2.1.3. Preparación de bacterias quimiocompetentes	42
2.2.1.4. Transformación de bacterias por choque térmico	42
2.2.2. Métodos generales de análisis y manipulación de ADN	43
2.2.2.1. Purificación de ADN plasmídico	43
2.2.2.2. Purificación de ADN genómico de levaduras	44
2.2.2.3. Extracción con fenol/cloroformo	44
2.2.2.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción	45
2.2.2.5. Reacciones de ligación de ADN plasmídico	45
2.2.2.6. <i>Dot Blot</i> de ADN	45
2.2.3. Métodos generales de análisis y manipulación de levadura <i>Pichia pastoris</i>	46

2.2.3.1.	Preparación de levaduras electrocompetentes	46
2.2.3.2.	Transformación de levaduras por electroporación	47
2.2.3.3.	Inducción de levaduras para la expresión de proteínas recombinantes	47
2.2.3.4.	Ruptura de levaduras para análisis de fracciones intracelulares	47
2.2.4.	Métodos generales de análisis y manipulación de proteínas	48
2.2.4.1.	Precipitación de muestras de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	48
2.2.4.2.	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) unidimensional	49
2.2.4.3.	<i>Western Blot</i>	50
2.2.4.4.	<i>Dot blot</i> de proteínas	51
2.2.4.5.	Cuantificación de proteínas totales	51
2.2.5.	Técnicas generales de cultivo celular	52
2.2.5.1.	Descongelación	52
2.2.5.2.	Propagación	52
2.2.5.3.	Congelación	52
2.2.5.4.	Transfección con polietilenimina (PEI)	53
2.2.5.5.	Obtención de extracto citoplasmático	53
2.2.5.6.	Microscopía	53
2.2.6.	Diseño, expresión y purificación de los antígenos recombinantes basados en la proteínas de Virus Andes	54
2.2.6.1.	Obtención de los antígenos recombinantes sGn y sGc expresados en células de mamíferos	54
2.2.6.1.1.	Diseño de los antígenos basados en las regiones expuestas de las glicoproteínas sGn y sGc de Virus Andes	54
2.2.6.1.2.	Generación de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos	55
2.2.6.1.2.1.	Generación de plásmidos para la obtención de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos	55
2.2.6.1.2.2.	Obtención de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos	56

2.2.6.1.2.3.	Amplificación de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos	57
2.2.6.1.2.4.	Titulación de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos	57
2.2.6.1.3.	Expresión de los antígenos sGn y sGc en células SiHa transducidas con los vectores adenovirales Ad-sGn y Ad-sGc	58
2.2.6.1.3.1.	Determinación de la multiplicidad de infección óptima para la expresión de los antígenos sGn y sGc	58
2.2.6.1.4.	Purificación de los antígenos sGn y sGc	59
2.2.6.2.	Obtención de los antígenos recombinantes Gns y Gcs expresados en <i>Pichia pastoris</i>	60
2.2.6.2.1.	Diseño de los antígenos basados en las regiones expuestas de las glicoproteínas Gns y Gcs de Virus Andes	60
2.2.6.2.2.	Generación de clon de levadura para la expresión del antígeno Gns	60
2.2.6.2.3.	Generación de clon de levadura para la co-expresión del antígeno Gcs	61
2.2.6.2.4.	Expresión de los antígenos recombinantes Gns y Gcs mediante fermentación de <i>Pichia pastoris</i> doblemente transformada	61
2.2.6.2.5.	Ruptura de las levaduras fermentadas para la expresión de los antígenos Gns y Gcs	61
2.2.6.2.6.	Solubilización de los antígenos Gns y Gcs	62
2.2.6.2.7.	Purificación de Gns y Gcs mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)	62
2.2.6.2.8.	Replegamiento de Gns y Gcs mediante ultrafiltración	63
2.2.6.3.	Obtención del antígeno recombinante AndesVac	64
2.2.6.3.1.	Diseño de antígeno multi-epítipo AndesVac basado en las proteínas Gn, Gc y N de Virus Andes	64
2.2.6.3.1.1.	Predicción de epítopes de células B presentes en las glicoproteínas de envoltura Gn y Gc de Virus Andes	64
2.2.6.3.1.2.	Predicción de epítopes de célula T presentes en la proteína NP de la nucleocápside de Virus Andes	64
2.2.6.3.1.3.	Diseño del antígeno multi-epítipo AndesVac	65



<b>2.2.6.3.2. Crecimiento bacteriano y optimización de los parámetros de expresión de AndesVac</b>	<b>65</b>
<b>2.2.6.3.2.1. Determinación de la cepa bacteriana óptima para la expresión de AndesVac</b>	<b>65</b>
<b>2.2.6.3.2.2. Determinación del medio de cultivo a utilizar para la expresión de AndesVac</b>	<b>66</b>
<b>2.2.6.3.2.3. Determinación de la temperatura y tiempo de inducción óptimos para la expresión de AndesVac</b>	<b>67</b>
<b>2.2.6.3.2.4. Determinación de la concentración de inductor óptima para la expresión de AndesVac</b>	<b>67</b>
<b>2.2.6.3.2.5. Determinación del efecto de aditivos de cultivo para la expresión de AndesVac</b>	<b>68</b>
<b>2.2.6.3.3. Extracción y solubilización del antígeno AndesVac</b>	<b>69</b>
<b>2.2.6.3.3.1. Determinación del efecto de las condiciones de solubilización de AndesVac</b>	<b>69</b>
<b>2.2.6.3.3.1.1. Solubilización de fracciones insolubles de AndesVac</b>	<b>69</b>
<b>2.2.6.3.4. Purificación de AndesVac mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)</b>	<b>70</b>
<b>2.2.6.3.5. Concentración y cambio de tampón del antígeno Andes Vac por ultrafiltración</b>	<b>70</b>
<b>2.2.7. Validación inmunológica de los antígenos recombinantes</b>	<b>71</b>
<b>2.2.7.1. Métodos generales empleados en los ensayos de inmunización</b>	<b>71</b>
<b>2.2.7.2. Formulaciones vacunales</b>	<b>71</b>
<b>2.2.7.2.1. Mantenimiento y cuidado de los animales</b>	<b>71</b>
<b>2.2.7.2.2. Inmunización de hámsteres sirios con los antígenos recombinantes</b>	<b>71</b>
<b>2.2.7.2.3. Obtención de muestras de plasma desde animales inmunizados</b>	<b>72</b>
<b>2.2.7.2.4. Determinación del título de anticuerpos totales mediante ELISA</b>	<b>72</b>
<b>2.2.7.2.5. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes</b>	<b>73</b>
<b>2.2.7.2.5.1. Construcción de vector lentiviral seudotipado con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes</b>	<b>73</b>

2.2.7.2.5.2. Diseño y síntesis del vector conteniendo las secuencias de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes	73
2.2.7.2.5.2.1. Inmunofluorescencia para evaluar el plásmido pEntry-GPC	73
2.2.7.2.5.2.2. Producción de vectores lentivirales	74
2.2.7.2.5.2.3. Concentración de vectores lentivirales	74
2.2.7.2.5.2.4. Transducción de células con vectores lentivirales seudotipados	75
2.2.7.2.5.2.5. Titulación de vectores lentivirales	75
2.2.7.2.5.3. Obtención del título de anticuerpos neutralizantes	75
2.2.7.2.6. Evaluación del perfil de citoquinas de esplenocitos	76
2.2.7.3. Análisis estadístico	77
3. RESULTADOS	78
3.1. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en células de mamíferos	78
3.2. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en la levadura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>	89
3.2.1. Diseño y expresión de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en <i>Pichia pastoris</i>	89
3.2.1.1. Diseño de la variante soluble de la glicoproteínas Gn de virus Andes para su expresión en <i>Pichia pastoris</i>	89
3.2.1.2. Expresión de la variante soluble de la glicoproteínas Gn de virus Andes para su expresión en <i>Pichia pastoris</i>	92
3.2.2. Diseño de la variante soluble de la glicoproteínas Gc de virus Andes para su expresión en <i>Pichia pastoris</i>	95
3.2.3. Co-expresión de la variante soluble de la glicoproteínas Gc de virus Andes para su expresión en el clon C4-G1 de <i>Pichia pastoris</i>	97
3.2.4. Producción, solubilización, purificación, replegamiento y caracterización de los antígenos recombinantes Gns y Gcs	101
3.3. Diseño, expresión y purificación de un antígeno recombinante multiepitópico basado en las proteínas de virus Andes	115
3.3.1. Diseño del antígeno recombinante multiepitópico basado en las proteínas de virus Andes	115
3.3.2. Expresión de AndesVac en bacterias <i>E. Coli</i>	118

3.3.3. Producción, solubilización y purificación del antígeno recombinante multiepitópico AndesVac	119
3.4. Evaluación de la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes Gns-Gcs y AndesVac en hámsteres sirios	121
3.4.1. Evaluación de los títulos de anticuerpos totales	121
3.4.2. Evaluación de los títulos de anticuerpos neutralizantes	123
3.4.2.1. Generación de vectores lentivirales seudotipados con las glicoproteínas de superficie Gn y Gc de virus Andes	123
3.4.2.2. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes	126
3.4.3. Evaluación del perfil de citoquinas	127
4. DISCUSIÓN	129
4.1. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en células de mamíferos	129
4.2. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en la levadura metilotrófica <i>Pichia pastoris</i>	130
4.3. Diseño, expresión y purificación de un antígeno recombinante multiepitópico basado en las proteínas de virus Andes	133
4.4. Evaluación de la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes Gns-Gcs y AndesVac en hámsteres sirios	134
RECAPITULACIÓN	139
CONCLUSIÓN	141
REFERENCIAS	142

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura I1: Representación esquemática del virión por hantavirus.</b>	<b>4</b>
<b>Figura I2: Representación esquemática de las glicoproteínas Gn y Gc de Hantavirus.</b>	<b>6</b>
<b>Figura I3: Ciclo viral de los Hantavirus.</b>	<b>11</b>
<b>Figura MM1: Esquema de inmunización de <i>M. Auratus</i>.</b>	<b>72</b>
<b>Figura R1: Secuencia aminoacídica de las variantes soluble de Gn (sGn) y Gc (sGc).</b>	<b>79</b>
<b>Figura R2: Constructos para la expresión de las variantes solubles de Gn (sGn) y Gc (sGc).</b>	<b>80</b>
<b>Figura R3: Identificación de sGn y sGc en el medio extracelular y extracto citoplasmático de células HEK293-FT transfectadas con los constructos pEntry-sGn y pEntry-sGc.</b>	<b>82</b>
<b>Figura R4: Evaluación de la expresión y secreción de las variantes solubles de Gn y Gc del virus Andes en cultivos de células transducidas con los vectores adenovirales Ad-sGn y Ad-sGc.</b>	<b>84</b>
<b>Figura R5: Purificación de sGn a partir del extracto citoplasmático de células SiHa transducidas con Ad-sGn.</b>	<b>86</b>
<b>Figura R6: Purificación de sGc a partir del medio de cultivo de células SiHa transducidas con Ad-sGc.</b>	<b>87</b>
<b>Figura R7: Reconocimiento de las moléculas sGn y sGc por suero de pacientes previamente infectados con el virus Andes.</b>	<b>88</b>
<b>Figura R8: Secuencia aminoacídica del antígeno recombinante Gns.</b>	<b>90</b>
<b>Figura R9: Constructo para la expresión de Gns en levaduras, pCBB-Gns.</b>	<b>91</b>
<b>Figura R10: <i>Dot Blot</i> de ADN de clones de levadura transformados con el plásmido pCBB-Gns.</b>	<b>92</b>
<b>Figura R11: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> del sobrenadante de inducción de los clones C4-G1 y C5-G1.</b>	<b>93</b>
<b>Figura R12: Análisis de densidad de los multímeros encontrados al expresar Gns.</b>	<b>94</b>
<b>Figura R13: Secuencia aminoacídica del antígeno recombinante Gcs.</b>	<b>95</b>
<b>Figura R14: Constructo para la expresión de Gcs en levaduras, pCBBz-Gcs.</b>	<b>96</b>

<b>Figura R15: SDS-PAGE y Western Blot del sobrenadante de inducción de los clones obtenidos por re-transformación de C4-G1 con pCBBz-Gcs.</b>	<b>98</b>
<b>Figura R16: SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones intracelulares de los clones obtenidos por re-transformación de C4-G1 con pCBBz-Gcs, posterior a su inducción.</b>	<b>100</b>
<b>Figura R17: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> de la fracción soluble de la ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2.</b>	<b>101</b>
<b>Figura R18: SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones soluble e insoluble luego de la ruptura del precipitado de fermentación del clon C11-G1+G2.</b>	<b>102</b>
<b>Figura R19: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> de las fracciones solubles luego de la solubilización en urea de la fracción insoluble de ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2.</b>	<b>103</b>
<b>Figura R20: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> de las fracciones insolubles luego de la solubilización en urea de la fracción insoluble de ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2.</b>	<b>104</b>
<b>Figura R21: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> de las fracciones soluble e insoluble de solubilización en condiciones no reductoras.</b>	<b>105</b>
<b>Figura R22: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> de las fracciones soluble e insoluble de solubilización en condiciones reductoras.</b>	<b>106</b>
<b>Figura R23: Purificación de los antígenos recombinantes Gns y Gcs solubilizados.</b>	<b>108</b>
<b>Figura R24: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> en condiciones no reductoras de los antígenos recombinantes previa y posteriormente al proceso de replegamiento.</b>	<b>110</b>
<b>Figura R25: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> en condiciones reductoras de los antígenos recombinantes previa y posteriormente al proceso de replegamiento.</b>	<b>111</b>
<b>Figura R26: SDS-PAGE y <i>Western Blot</i> de los antígenos recombinantes post-replegamiento.</b>	<b>112</b>
<b>Figura R27: Análisis de ocupación de sitios potenciales de N-Glicosilación en los antígenos recombinantes.</b>	<b>114</b>
<b>Figura R28: Secuencia aminoacídica del precursor de las glicoproteínas de Virus Andes (GPC).</b>	<b>115</b>

<b>Figura R29: Secuencia aminocídica de la nucleocapside (N) de Virus Andes.</b>	<b>116</b>
<b>Figura R30: Secuencia aminocídica del antígeno multiepitópico AndesVac.</b>	<b>117</b>
<b>Figura R31: Constructo para la expresión de AndesVac en bacterias, pET22b-AndesVac.</b>	<b>117</b>
<b>Figura R32: Análisis de expresión de AndesVac en diferentes cepas de <i>E. coli</i>. A.</b>	<b>118</b>
<b>Figura R33: Purificación del antígeno recombinante AndesVac.</b>	<b>120</b>
<b>Figura R34: Gráficos con los títulos de anticuerpos totales inducidos en los hámsteres inmunizados con las distintas formulaciones vacunales.</b>	<b>122</b>
<b>Figura R35: Constructo para la generación de vectores lentivirales seudotipados con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes.</b>	<b>123</b>
<b>Figura R36: Evaluación de la expresión de Gn y Gc en la superficie de vectores lentivirales seudotipados con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes.</b>	<b>125</b>
<b>Figura R37: Transducción de células por Lenti-GPC.</b>	<b>126</b>
<b>Figura R38: Gráfico con los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos en los hámsteres inmunizados con el complejo Gns-Gcs usando Hidróxido de aluminio como adyuvante.</b>	<b>127</b>
<b>Figura R39: Perfil de citoquinas inducido por los antígenos recombinantes Gn y Gc.</b>	<b>128</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla I1: Principales candidatos vacunales contra SCPH en investigación.</b>	<b>19</b>
<b>Tabla MM2: Tampones empleados para la solubilización del antígeno recombinante AndesVac.</b>	<b>35</b>
<b>Tabla MM2: Protocolo de preparación de geles denaturantes de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico.</b>	<b>49</b>
<b>Tabla MM3: Partidores empelados para la evaluación de cambios en los niveles relativos de ARNm de citoquinas en hámster mediante RT-qPCR.</b>	<b>77</b>



## LISTA DE ABREVIACIONES

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico.
AIF:	Adyuvante Incompleto de Freund.
AIOH:	Alhydrogel 2%.
Amp:	Ampicilina
ANDV:	Virus Andes.
ANOVA:	<i>Analysis of Variance.</i>
ARN:	Ácido Ribonucleico.
ARNc:	ARN Complementario.
ARNm:	ARN Mensajero.
ARNv:	ARN Viral.
AOX1:	Alcohol Oxidasa 1.
BCA:	Ácido Bicinconánico.
BSA:	Albúmina de Suero Bovino.
BSL-4:	Bioseguridad Nivel 4.
BUNV:	Virus Bunyamwera.
Cam:	Cloranfenicol.
CMV:	Citomegalovirus.
DCs:	Células Dendríticas.
DMEM:	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium.</i>
D.O.:	Densidad Óptica.
DTT:	Ditiotreitol.
EDTA:	Ácido Etilendiaminotetraacético.
ELISA:	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.</i>
ER:	Retículo Endoplásmico.
FDA:	<i>Food and Drug Administration.</i>
FHSR:	Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal.
G418:	Geneticina.
GFP:	Proteína Fluorescente Verde.
GMP:	Buenas Prácticas de Manufactura.
GPC:	Precursor de Glicoproteínas.
HR:	Humedad Relativa.
IFN-β:	Interferón Beta.





IFN- $\gamma$ :	Interferón Gamma.
IL-4:	Interleukina 4.
IL-6:	Interleukina 6.
IL-12:	Interleukina 12.
IMAC:	Cromatografía de Afinidad a Iones Metálicos Inmovilizados.
IRES:	Sitio Interno de Entrada al Ribosoma.
IRF-3:	Interferón 3.
ISP:	Instituto de Salud Pública.
Kan:	Kanamicina.
LB:	Medio Luria Bertani.
MOI:	<i>Multiplicity Of Infection.</i>
NE:	Nefropatía Epidémica.
NF- $\kappa\beta$ :	Factor Nuclear Kappa Beta.
NSs:	Proteína No Estructural.
OPD:	o-Fenilendiamina.
ORF:	Marco de Lectura Abierto.
p/v:	Peso/Volumen.
PBS:	Tampón Fosfato Salino.
PFA:	Paraformaldehído.
PEI:	Polietilenimina.
PMSF:	Fluoruro de Fenilmetilsulfonilo.
PNO:	Procedimientos Normalizados de Operación.
PSA:	Persulfato de Amonio.
PVDF:	Polifluoruro de Vinilideno.
RdRp:	ARN Polimerasa Dependiente de ARN.
RNP:	Ribonucleoproteína.
rpm:	Revoluciones por minuto.
SDS-PAGE:	<i>Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>
SB:	Medio Super Broth.
SCPH:	Síndrome Cardiopulmonar causado por Hantavirus.
SDS:	Dodecil Sulfato de Sodio.
SNV:	Virus Sin Nombre.
Str:	Estreptomicina.
TAE:	Tris-Acetato-EDTA.



TB: Medio Terrific Broth.  
TBS: Tampón Tris Salino.  
UPE: Unidad de Prototipado y Escalamiento.  
USAMRIID: *U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases.*  
v/v: Volumen/Volumen.  
VLPs: Partículas Tipo Virus.  
YNB: Medio *Yeast Nitrogen Base.*  
Zeo: Zeocina.



**ANEXO 1**  
**Certificado de Bioética**





## INFORME COMITÉ DE BIOÉTICA Y BIOSEGURIDAD

Comité de Ética y Bioseguridad Secretaría de Investigación Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción  ❖ Dra. Roxana Pincheira B. ❖ Dra. Verónica Madrid V. ❖ Dra. Mafalda Maldonado V. ❖ Sr. Joaquín Rojas F.	PROYECTO	Tesis Doctorado
	TÍTULO	"DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE UN CANDIDATO VACUNAL RECOMBINANTE CONTRA HANTAVIRUS BASADO EN LAS GLICOPROTEÍNAS DE SUPERFICIE DEL VIRUS ANDES "
	INVESTIGADOR PRINCIPAL	María Francisca Starck Méndez

A solicitud de la Srta. María Francisca Starck Méndez, se recibe documento (adjunto) con precisiones a la metodología incluida en la postulación al proyecto Tesis Doctorado antes mencionado, solicitando que este Comité emita una carta de aprobación.

Estas precisiones, así como la metodología del Proyecto, han sido analizadas de acuerdo a las recomendaciones de GUIDE for the Care and Use of Laboratory Animals (Institute of Laboratory Animal Resources Commission on Life Science National Research Council), los principios elaborados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas, Organización Mundial de la Salud (1985), el texto "Aspectos Bioéticos de la Experimentación Animal", editado por CONICYT en 2009, y el "Manual de Bioseguridad" editado por CONICYT en 2008.

De acuerdo a lo señalado en el documento, las precisiones a la metodología son consecuentes con el principio de las "3 Rs" empleado para la investigación con animales. En particular:

1. Dado que no existe un modelo alternativo para realizar el estudio, el Investigador necesita emplear animales Hámster Sirio Dorado (*Mesocricetus auratus*), correspondiendo a especies apropiadas para realizar la investigación, lo que representa una buena aproximación al requisito de REEMPLAZAR.
2. En términos de REDUCIR, se utilizará un número de animales dentro de los rangos admisibles.
3. El uso de analgesia y eutanasia son apropiados para la especie en términos de REFINAR. Además, el Proyecto incluye el uso de un protocolo de supervisión de animales de experimentación.
4. En consecuencia, los protocolos existentes son adecuados.
5. El estudio propuesto permitirá realizar avances en los conocimientos en beneficio humano y animal.
6. El personal involucrado es idóneo en el manejo y uso de las muestras animales.



7. Los estudios serán desarrollados en el LABORATORIO DE BIOFÁRMACOS RECOMBINANTES, donde se encuentran disponibles tanto las facilidades como el equipamiento necesarios para realizar los estudios con animales incluidos en el Proyecto.

8. Cabe mencionar que nuestra Facultad cuenta con los servicios de la Unidad de Seguridad MATPEL ([www2.udec.cl/matpel](http://www2.udec.cl/matpel)), quienes colectan y procesan en forma rutinaria los residuos biológicos y químicos generados por nuestros investigadores, de acuerdo a las indicaciones del "Manual de Bioseguridad" de CONICYT.

En consecuencia, el comité de Bioética y Bioseguridad de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción valida los estudios señalados.

Sin otro particular, les saluda muy atentamente,

**Dra. Roxana Pincheira B.**  
Departamento de Bioquímica Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



**Sr. Joaquin Rojas F.**  
Médico Veterinario  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Dra. Verónica Madrid V.**  
Departamento de Microbiología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción

**Dra. Mafalda Maldonado Villagrán**  
Departamento de Fisiopatología  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Universidad de Concepción



## RESUMEN

El Síndrome Cardiopulmonar causado por Hantavirus (SCPH) es una enfermedad endémica de Chile y de elevada mortalidad. En nuestro país, el virus Andes es el agente etiológico de esta patología. Su transmisión ocurre principalmente por contacto con excreciones y secreciones de roedores infectados, pero en el caso particular del virus Andes también es posible la transmisión de persona a persona. Actualmente, no existen vacunas ni tratamientos para esta patología. Sin embargo existe evidencia que demuestra que anticuerpos neutralizantes contra las glicoproteínas Gn y Gc de Hantavirus son suficientes y necesarios para proteger de la infección y desarrollo de SCPH en hámsteres sirios, modelo animal de esta enfermedad.

Con el objetivo de desarrollar una vacuna contra SCPH, se desarrollaron distintos antígenos para ser probados como candidatos vacunales. Inicialmente, se diseñaron antígenos consistentes en los dominios expuestos de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes, denominados sGn y sGc. Fueron expresados en células de mamíferos transducidas con un vector adenoviral y posteriormente purificados. Los antígenos fueron reconocidos por el suero de pacientes sobrevivientes de SCPH. Sin embargo, los bajos niveles de expresión de los antígenos limitan el uso de estos como candidato vacunal. En vista de estos resultados, los antígenos fueron modificados para su expresión en levaduras, denominados Gns y Gcs. Al ser co-expresados, los antígenos Gns y Gcs parecen formar agregados de alto peso molecular y altamente estables. Ambos antígenos fueron solubilizados, purificados y posteriormente replegados. En paralelo, se trabajó en un antígeno recombinante basado en epítopes lineales presentes en las proteínas Gn, Gc y N de virus Andes. Este antígeno, denominado AndesVac, fue expresado de manera insoluble en bacterias. El antígeno AndesVac solubilizado fue purificado con una pureza superior al 95% luego de un único paso de IMAC.

Finalmente, los antígenos purificados fueron empleados en un ensayo de inmunización en hámsteres sirios. Tanto el complejo antigénico Gns-Gcs como AndesVac, fueron capaces de inducir una respuesta de anticuerpos IgG totales significativa. La formulación capaz de generar mayores títulos de anticuerpos neutralizantes consiste en el complejo antigénico Gns-Gcs adyuvado con Alhydrogel, la cual también generó títulos significativos de anticuerpos neutralizantes y una elevación de los niveles relativos de ARNm de las citoquinas IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-6.

## ABSTRACT

Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome (HCPS) is a Chile's endemic disease with a high mortality rate. In our country, Andes virus is the etiologic agent of this pathology. Its transmission occurs mainly by contact with infected rodents's excretions and secretions, but in the particular case of the Andes virus it is also possible person to person transmission. Currently, there are no vaccines or treatments for this pathology. However, evidence shows that neutralizing antibodies against Hantaviruses's Gn and Gc glycoproteins are sufficient and necessary to protect against infection and development of HCPS in Syrian hamsters, the animal model of this disease.

In order to develop a vaccine against HCPS, different antigens were developed to be tested as vaccine candidates. Our first strategy was designing antigens consisting of the exposed domains of the Gn and Gc glycoproteins of Andes virus, called sGn and sGc. These antigens were expressed in mammalian cells transduced with an adenoviral vector and subsequently purified. Both antigens were recognized with previously infected patients's serum. However, low levels of antigens expression limit the use of these as a vaccine candidate. In view of these results, the antigens were modified for their expression in yeasts, called Gns and Gcs. When co-expressed, the Gns and Gcs antigens appear to form high molecular weight and highly stable aggregates. Both antigens were solubilized, purified and refolded. In parallel, we worked on a recombinant antigen, based on linear epitopes presents in the Gn, Gc and N proteins of Andes virus. This antigen, called AndesVac, is expressed insoluble in transformed bacterias. The solubilized AndesVac antigen was purified with a purity greater than 95% after a single IMAC step.

Finally, the purified antigens were used in an immunization assay in Syrian hamsters. Both the Gns-Gcs antigenic complex and AndesVac antigen were able to induce a significant total antibody response. The Gns-Gcs antigen complex adjuvated with Alhydrogel formulation was the one that generates higher total antibodies titers. This vaccine candidate also generates a significant titer of neutralizing antibodies, and an increase in the relative levels of IL-12, , IFN- $\gamma$  and IL-6's cytokines mRNA.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Hantavirus

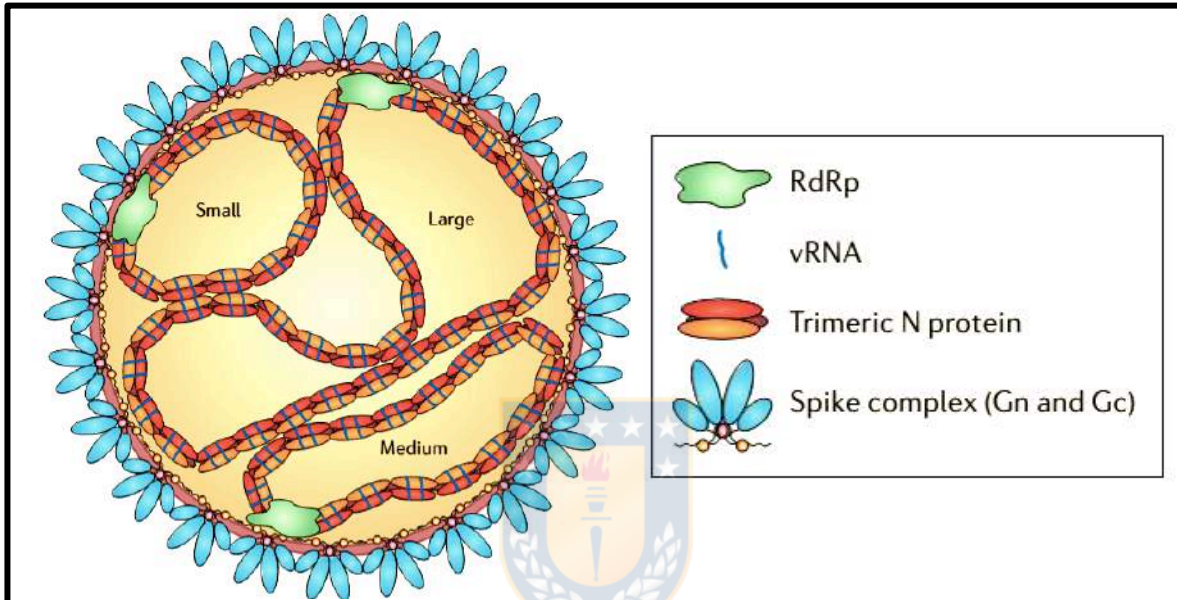
Los *Orthohantavirus*, comúnmente conocidos como *Hantavirus*, son virus que pertenecen a la familia *Hantaviridae*, del orden *Bunyavirales* (Maes et al., 2018)(Maes et al., 2018). Fueron identificados inicialmente en tropas estadounidenses que peleaban en la guerra de Vietnam, en las cercanías del río Hantaan (Mccaughey & Hart, 2000; Muranyi, 2005; Schmaljohn, 1997)(Mccaughey & Hart, 2000; Muranyi, 2005; Schmaljohn, 1997). Los Hantavirus son transmitidos principalmente a través de roedores, los cuales actúan como reservorio de estos virus. Algunos miembros de este género son capaces de causar patologías en el ser humano. De esta forma, se clasifican en dos grupos principales: aquellos causantes de Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR), presentes principalmente en Europa y Asia, y los que ocasionan Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH), exclusivos del continente americano (Avšič-Županc & Korva, 2014; Bi et al., 2008; Jonsson et al., 2008; MacNeil et al., 2011; Mccaughey & Hart, 2000; Muranyi, 2005; Vinh & Embil, 2009)

#### 1.1.1. Características moleculares

Su genoma es ARN simple hebra de polaridad negativa y tri-segmentado (Mccaughey & Hart, 2000; Plyusnin et al., 1996). Los segmentos genómicos se denominan L (*Large*), M (*Medium*) y S (*Small*) de acuerdo a su tamaño. El marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*; ORF) del segmento L codifica la proteína L o ARN-polimerasa L viral dependiente de ARN (RdRp) (Muranyi, 2005). El ORF del segmento M codifica para el precursor de las glicoproteínas (Glycoprotein precursor; GPC) que posteriormente madura en las glicoproteínas de superficie Gn y Gc (también denominadas G1 y G2). El ORF del segmento S codifica para la proteína de la nucleocápside, también llamada nucleoproteína o proteína N. Adicionalmente, en algunos miembros del género hantavirus existe un ORF adicional superpuesto en el segmento S que codifica para una proteína no estructural (Non-structural protein; NSs) (Bi et al., 2008; Hepojoki et al., 2012; Vaheri et al., 2013) (Fig I1). Los segmentos de ARN virales se encuentra encapsidado el interior del virión por la nucleoproteína (también denominada proteína N), formando ribonucleoproteínas (RNPs) (Battisti et al., 2011; Hepojoki et al., 2010; Hepojoki et al., 2012; Ravkov & Compans, 2001).



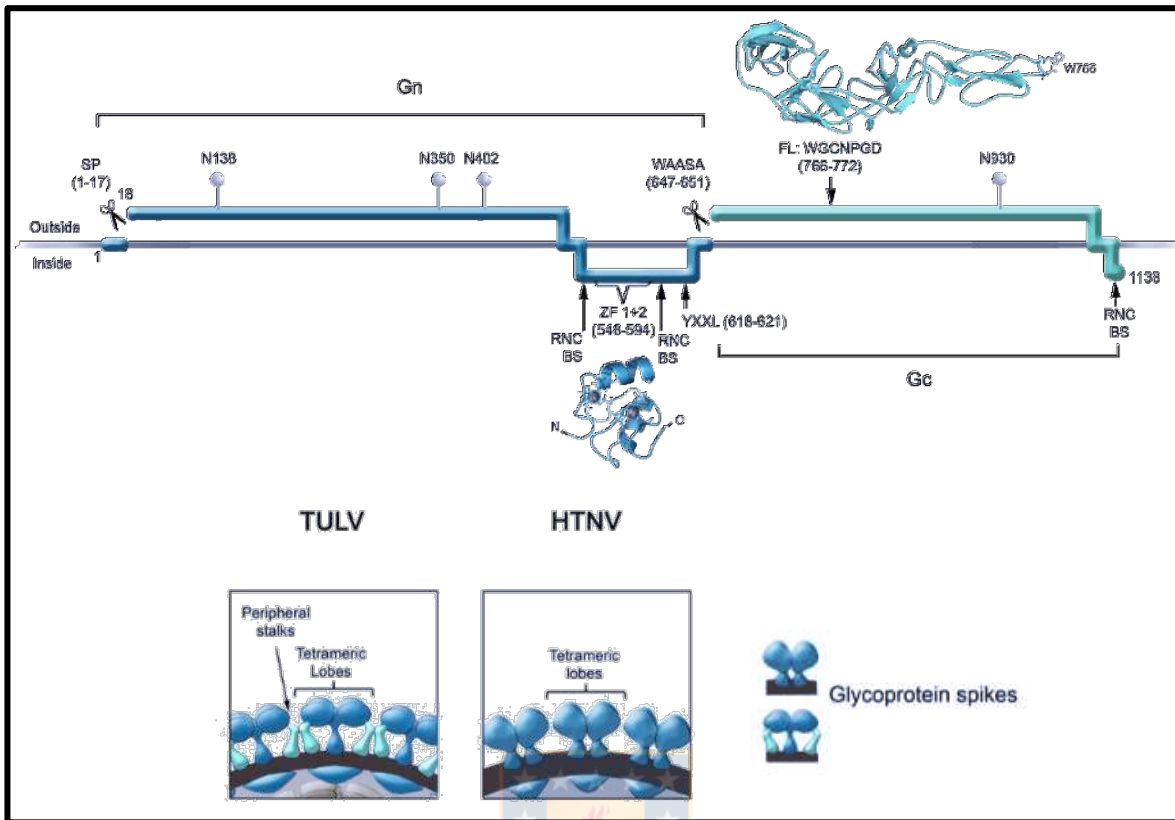
Los complejos de RNP se encuentran junto con la ARN-polimerasa viral dependiente de ARN (RNA-dependent RNA polymerase; RdRp, también denominada proteína L) rodeadas de la envoltura lipídica del virión. En esta envoltura lipídica, de alrededor de 5nm de grosor, se encuentran insertas las glicoproteínas virales Gn y Gc a la forma de heterotetrámeros, formando un patrón tipo rejilla en la superficie de la partícula viral (Hepojoki et al., 2012; Jonsson et al., 2010; Vaheri et al., 2013).



**Figura I1: Representación esquemática del virión por hantavirus.** La partícula hantaviral contiene el genoma de ARN (ARNv) viral trisegmentado, denominados *Large*, *Medium* y *Small*. Estos son encapsidado por la proteína de la nucleocápside (N). La parte externa del virión consta de “espigas” que comprenderían cuatro unidades de cada una glicoproteínas, Gn y Gc. El genoma viral se replica y se transcribe por la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Modificado desde Vaheri y cols, 2013).

La proteína más grande codificada por los hantavirus es la proteína L o RdRp (Hepojoki et al., 2012), con una masa molecular de aproximadamente 250 kDa (Kukkonen et al., 2005; Kukkonen et al., 2004). La proteína L es la transcriptasa y replicasa del ARN viral, transcribiendo el ARN mensajero (ARNm) de polaridad positivo y replicando el ARN genómico a través de un intermediario antígenómico de polaridad positiva (Kukkonen et al., 2004). Se ha determinado que existe un dominio con actividad endonucleasa en la región N terminal de la proteína L (Fernández-García et al., 2016), que permite remover las caperuzas (*caps*) de los ARNm celulares para cebar sus propios ARNm, en un proceso denominado *cap-snatching* (Heinemann et al., 2013).

El GPC codificado en el segmento M es una poliproteína de entre 1133 y 1158 aa. El clivaje co-traduccional de GPC en una secuencia conservada WASAA da lugar a las proteínas Gn y Gc (provenientes de las regiones N y C terminal del GPC, respectivamente) (Löber et al., 2001) (Fig. I2-A). Los pesos moleculares estimados de las glicoproteínas maduras corresponden a 70 KDa para Gn y 50 KDa para Gc (Deyde et al., 2005; Hepojoki et al., 2010). Las formas maduras de Gn y Gc están modificadas por glicanos involucrados en el correcto plegamiento de las proteínas, unión al receptor, fusión de membranas y morfogénesis viral. De esta forma, mutaciones en los sitios de N-glicosilación afectarían la formación de los complejos de Gn y Gc, influenciando así su localización intracelular y la formación de epítopes (Hepojoki et al., 2012). Gn y Gc son proteínas transmembrana tipo I (Simmons & Riley, 2002), con cuatro unidades de Gn y cuatro unidades de Gc formando una espina o pico (Cifuentes-Muñoz et al., 2014) (Fig. I2-B). Las colas citoplasmáticas de Gn y Gc interactúan con la las RNP del interior a través de interacciones proteína-proteína (proteína N) y de interacciones proteína-ARN (ARNv) (Vaehri et al., 2013). En tanto, los dominios externos participarían de la interacción con receptores tipo integrina de las células a infectar (Jonsson et al., 2010; Simmons & Riley, 2002).



**Figura I2: Representación esquemática de las glicoproteínas Gn y Gc de Hantavirus.**

**A.** Representación esquemática de las regiones, estructuras y funciones de las glicoproteínas de hantavirus. Los ectodominios de la glicoproteína Gn (cian oscuro) y Gc (cian claro), las regiones transmembrana y los endodominios se representan de acuerdo con su ubicación con respecto a la membrana (línea gris horizontal). Las secuencias de péptido de señal (SP) y WAASA indican los sitios de escisión dentro de GPC. N representa la ubicación de los residuos de asparagina que probablemente posean glicosilaciones; Los números que siguen a estas letras indican el número de residuo correspondiente dentro de GPC de ANDV. ZF 1 + 2 indica la ubicación de los dos dominios de dedos de zinc, RNC-BS indica los sitios de unión a ribonucleocapsidas sugeridos. El motivo YxxL representa los residuos implicados en la ubiquitinación. FL indica la ubicación del supuesto bucle de fusión de Gc. **B.** Vista ampliada de las espinas formadas en la superficie de HTNV y TULV. Las proyecciones de las glicoproteínas de superficie se basan en los mapas crio-ET de cada virus (Modificado desde Cifuentes-Muñoz y cols, 2014).

La proteína N, codificada en el segmento S, es una proteína no glicosilada con una masa molecular de aproximadamente 50 kDa. Tanto la proteína N como la proteína L son necesarias para la replicación viral. Por lo tanto, se cree que la transcripción y posterior traducción del ARNm precederían el inicio de la replicación, y la concentración de proteína N libre mediaría el cambio de síntesis de ARNm a replicación (Hepojoki et al., 2012). Además, trímeros de la proteína N se unen a las estructuras *panhandle* presentes sólo en el ARNV y ARN complementario (ARNc), dejando al ARNm desnudo (Mir & Panganiban, 2004). La unión de la proteína N al ARNV se ha propuesto cambiaría su conformación, permitiendo la unión de nuevas proteínas N y eventualmente permitiendo la formación de un complejo RNP, conteniendo un único segmento genómico (Hepojoki et al., 2012). El segmento S de algunos hantavirus contiene un ORF adicional que se superpone al ORF codificante de la proteína N, y que codifica para una proteína no estructural o NSs. Se ha reportado que NSs inhibe la expresión de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e interfiere con la actividad del factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) y del factor regulador de interferón 3 (IRF-3) (Hepojoki et al., 2012; Hussein & Mir, 2013; Vaheiri et al., 2013).

### 1.1.2. Ciclo replicativo

Los hantavirus infectan células endoteliales, epiteliales, dendríticas foliculares, macrófagos y linfocitos a través de la unión de las glicoproteínas virales con receptores en la superficie de la célula huésped (Borges et al., 2006). Distintos estudios *in vitro* sugieren que los receptores que interactúan principalmente con las glicoproteínas hantavirales para su entrada a la célula son las integrinas: integrina- $\beta$ 1 en el caso de hantavirus no patógenos e integrina- $\beta$ 3 en el de hantavirus patógenos (Gavrilovskaya et al., 1998, 1999, 2002; Jonsson et al., 2010; Matthys et al., 2010). Sin embargo, existe poca evidencia *in vivo*, por lo que es posible que el receptor natural de los hantavirus no sean integrinas (Jonsson et al., 2010; Vaheiri et al., 2013). Luego de la unión a la superficie celular, el hantavirus invasor es internalizado por la célula. Si bien algunos hantavirus son ingresados a través de endocitosis dependiente de clatrina (Jonsson et al., 2010) en otros casos no es así, y existe evidencia en aumento que sugiere que los hantavirus, de manera similar a otros miembros de la familia *Hantaviridae*, utilizan más de una vía para su entrada a la célula. Después de la internalización, los viriones son transportados a endosomas tempranos y posiblemente a endosomas tardíos, en el que se desprenden del receptor celular debido a una disminución en el pH (desde un pH 6,0-6,5 en endosomas tempranos a un pH 5,0-6,0 en endosomas tardíos).

Este bajo pH de los endosomas desencadena un cambio conformacional de la glicoproteína Gc que permite la unión a la membrana endosomal, dando lugar a más cambios conformacionales y la eventual fusión de las membranas virales y celulares. El material genético (RNP) se libera en el citoplasma y es entonces, presumiblemente, transportado al sitio putativo de la replicación viral a través de interacciones con la maquinaria de transporte celular. También es posible que las rondas iniciales de la transcripción y la replicación se lleven a cabo directamente después de la fusión con la membrana endosomal (Vaheiri et al., 2013).

La síntesis de ARN virales desde el genoma del hantavirus implica la transcripción (para producir los ARNm que codifican las proteínas virales) y la replicación (para producir ARN genómico viral). Ambas actividades se atribuyen a la proteína L viral (Vaheiri et al., 2013). La caracterización de los mecanismos de síntesis de ARN en los hantavirus se ha visto obstaculizado por la falta de sistemas de genética inversa adecuados para hantavirus, aunque se ha informado de algunos intentos relativamente exitosos (Flick et al., 2003). Dado que los hantavirus son virus ARN de polaridad negativa, primero deben transcribir ARNm viral, que se produce en una corta ráfaga llamada transcripción primaria, después de lo cual el ARNm del virus se traduce en proteínas víricas funcionales. Para ello, la proteína L del virus sintetiza el ARNm viral. Este ARNm viral es diferente de ARNm celular en varios aspectos. En primer lugar, los hantavirus no poli-ciclan sus extremos 3', haciéndolos distintos de los ARNm eucarióticos con los que coexisten, además de ser distintos al ARNv, ya que poseen una delección en este extremo que impide la formación de la estructura tipo *panhandle*. Adicionalmente, los hantavirus carecen de la maquinaria endógena para añadir la caperuza o *cap* en su extremo 5'. Dado que el *cap* 5' es necesario para la traducción de ARNm en células de mamífero, los hantavirus "roban" estas caperuzas desde ARNm celulares para la iniciación de la transcripción del ARNm viral en un proceso denominado "*cap snatching*" (Simmons & Riley, 2002). En el caso de hantavirus, se ha sugerido que esto implica la localización de las proteínas virales (las proteínas N y L) en cuerpos de procesamiento citoplasmáticos (cuerpos P), donde pueden unirse las caperuzas de ARNm celulares destinados a degradación (Vaheiri et al., 2013), resultando en extensiones 5' heterogéneas, provenientes de la célula hospedadora, de entre 10 y 15 bases en el ARNm viral. Se ha sugerido que los ARNm de la célula hospedadora son procesados para el uso de su caperuza en el ARNm viral por la proteína L (Fernández-García et al., 2016; Heinemann et al., 2013; Vaheiri et al., 2013).

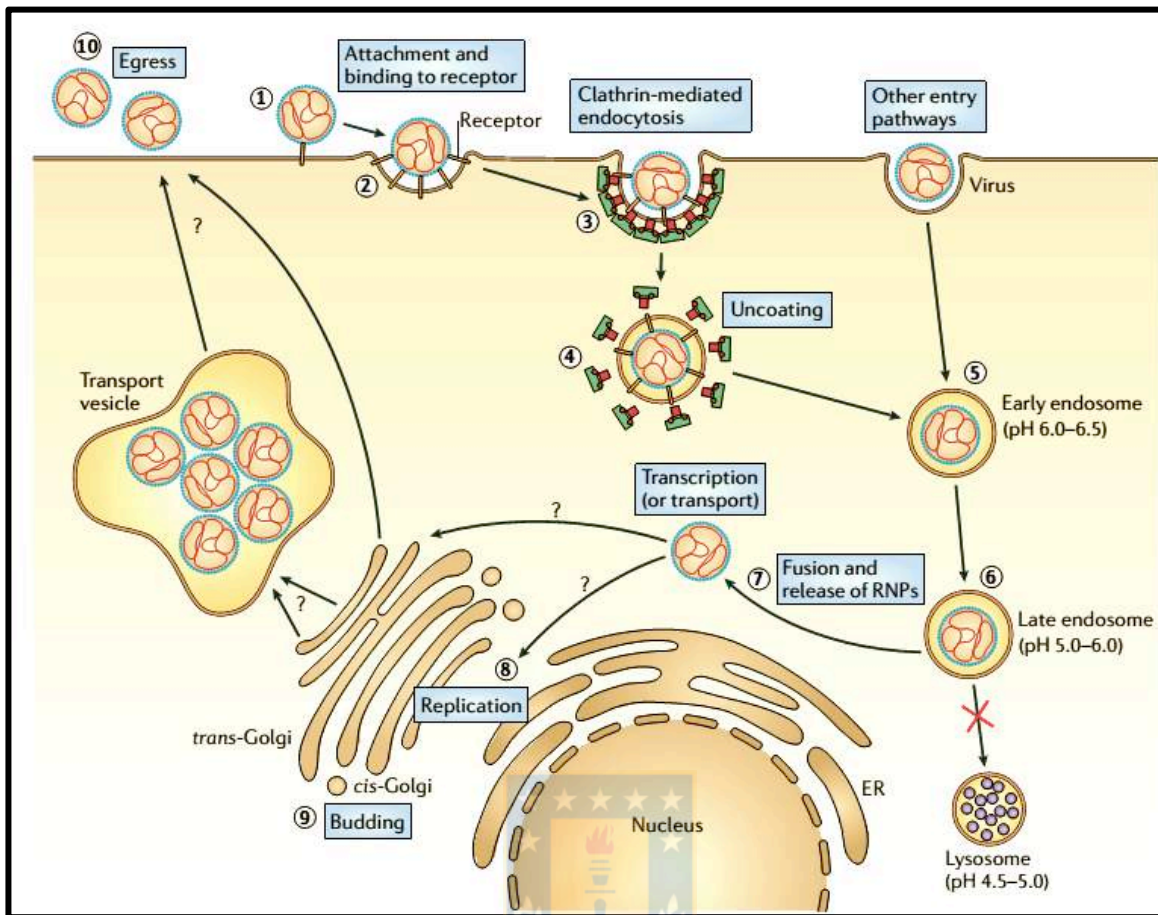
En el caso de la replicación, es necesario que el ARNv sea transcrito en primer lugar a ARNc (de polaridad positiva), el cual posteriormente es utilizado como templado para la multiplicación del ARNv. Este ARNc no está truncado en su extremo 3', resultando en copias perfectamente complementarias, de longitud completa, del ARNv (a diferencia del ARNm viral), por lo que es capaz de formar estructuras tipo *panhandle* y, por lo tanto, de ser encapsidado por la proteína N (Simmons & Riley, 2002; Vaheri et al., 2013).

Aún se desconoce dónde estos procesos son llevados a cabo al interior de la célula. Evidencia obtenida del virus Bunyamwera (BUNV), un orthobunyavirus del orden *Bunyavirales*, sugiere que se produciría en una "fábrica viral" formada en las membranas del retículo endoplásmico (*Endoplasmic Reticulum*; ER) y aparato de Golgi, que proporcionarían los componentes requeridos para la transcripción, replicación y producción de proteínas virales. Dado que en el caso de los hantavirus las proteínas N y L se han encontrado asociadas a membranas del complejo de Golgi, tanto en la infección de células con hantavirus como al expresar estas proteínas por sí solas, se ha propuesto que estos procesos se llevan a cabo en hantavirus de forma similar a lo demostrado para BUNV (Kukkonen et al., 2004; Ravkov & Compans, 2001). Una vez que el ARNv ha sido replicado, es encapsidado por la proteína N. La encapsidación de ARNv y ARNc se cree que comienza por la formación de trímeros de proteína N. Las regiones no codificantes (*Non-Coding Regions*; NCRs) 3' y 5' del ARNv son complementarias y forman estructuras tipo *panhandle*, la cual se cree es reconocida por los trímeros de proteína N, alterando su conformación y permitiendo la unión de nuevas unidades de proteína N hasta la formación del complejo de RNP, cada uno conteniendo únicamente un segmento de ARNv (Hussein & Mir, 2013). Aún se desconoce cómo la proteína L es empaquetada en los viriones, así como también cómo el virión se asegura de contener cada una de las RNPs (conteniendo cada uno de los segmentos de ARNv) durante el ensamblaje, aunque se ha sugerido que la cola citoplasmática de la proteína Gn podría cumplir un papel fundamental en estos procesos (Piper et al., 2011).

Dado que los hantavirus son virus con envoltura, deben pasar a través de membranas lipídicas de la célula hospedadora para obtener la suya. Una característica de los miembros de la familia *Bunyavirales*, similares a los *Hantavirales*, es que el *budding* o gemación de los viriones ocurre en el aparato de Golgi y no en la membrana celular, sin embargo este mecanismo no ha sido aún bien descrito para hantavirus (Simmons & Riley, 2002).

Sin embargo, se sabe que el GPC es co-traduccionalmente clivado en Gn y Gc en el lumen del ER, y que posteriormente estas proteínas maduran en el aparato de Golgi, donde ocurre su glicosilación. Se cree que señales de retención de Golgi, presentes en las secuencias aminoacídicas de estas proteínas, resultan en la acumulación de Gn y Gc en el mismo, permitiendo el *budding* de las partículas virales la membrana del aparato de Golgi. Lo viriones formados luego se liberan al medio extracelular desde el aparato de Golgi, presumiblemente a través de exocitosis, pero los detalles de la salida de los viriones son aún desconocidos (Simmons & Riley, 2002; Vaheri et al., 2013) (Fig. I3).





**Figura I3: Ciclo viral de los Hantavirus.** Los pasos del “ciclo de vida” de los hantavirus incluyen la unión de la partícula viral a su receptor en la superficie de la célula a infectar (paso 1), lo que induce la señalización de su endocitosis (paso 2). Luego, el virión es internalizado a través de endocitosis mediada por clatrina (paso 3) o a través de otras vías. En el caso de hantavirus endocitados por clatrina, la capa de clatrina es desmontada (paso 4) y el virión es albergado al interior de un endosoma temprano (paso 5), el cual madura en un endosoma tardío (paso 6). El cambio de pH en el endosoma tardío lleva a cambios conformacionales en la proteína de fusión viral, lo que lleva a la fusión de la membrana viral con la membrana endosomal, y que finalmente resulta en la liberación al citoplasma de las RNPs (paso 7). La transcripción inicial del virus se llevaría a cabo en el sitio de desnudamiento, o bien podría ocurrir en ER o Golgi, en tanto la replicación se llevaría a cabo en las fabricas virales asentadas en el RE-compartimento intermedio del Golgi (ERGIC) o bien en el cis Golgi (paso 8). El *budding* de los viriones ocurriría en el cis Golgi (paso 9), desde donde serían transportados a la membrana plasmática para su liberación (paso 10). (Extraído desde Vaheri y cols, 2013).



### 1.1.3. Transmisión y distribución

Los hantavirus son transportados por roedores o insectívoros, hospederos capaces de diseminar el virus a través de sus excreciones y secreciones (saliva, heces y orina) y sus aerosoles (Simmons & Riley, 2002), aunque se han reportado casos de transmisión a través de mordeduras y transfusiones sanguíneas (Hepojoki et al., 2012). Además, en el caso del virus Andes (ANDV) se han reportado casos de transmisión persona-persona (Jonsson et al., 2010; Martinez et al., 2005). La distribución geográfica y epidemiología de los casos de hantavirus en humanos se consideran consecuencia de la distribución de su hospedero principal (Jonsson et al., 2010; Zeier et al., 2005). En base a su reservorio principal, se clasifica a los hantavirus en cuatro grupos. El primer grupo comprende a los hantavirus causantes de FHSR, albergado por ratas y ratones del Viejo Mundo. Dentro de este grupo destacan los virus Hantaan y Seoul (Jiang et al., 2016, 2017). Hantavirus del segundo grupo son transportados por ratas campestres y topillos, causantes de Nefropatía epidémica (*Nephropathia epidemica*; NE), como por ejemplo los virus Dobrava-Belgrado y Puumala (Jiang et al., 2016, 2017), o considerados apatogénicos. Los miembros del tercer grupo, transmitidos por y ratones del Nuevo Mundo, causan SCPH. Característicos de este grupo son los virus Sin Nombre en América del norte y Andes en América del Sur. Finalmente, el cuarto grupo es el más recientemente descrito, transmitido por musarañas, para los cuales no se han descrito síntomas o enfermedades relacionadas (Hepojoki et al., 2012).

### 1.2. Virus Andes

El virus Andes es el agente etiológico de SCPH en el sur de América del Sur más importante (Medina et al., 2009), con casos presentes al menos en Argentina, Chile y Uruguay (Martinez et al., 2005). A diferencia de otros miembros del género *Hantavirus*, se han reportado casos de transmisión persona a persona de ANDV (Martinez et al., 2005) y debe ser manipulado en condiciones de máxima seguridad. Adicionalmente, ANDV es el único hantavirus americano que ha sido posible aislar desde suero de un paciente infectado (Galeno et al., 2002), y el único hantavirus que cuenta con un modelo animal para el SCPH: el hámster Sirio dorado (*Mesocricetus auratus*) (J. W. Hooper et al., 2001; Miao et al., 2019; Wahl-Jensen et al., 2007; Zivcec et al., 2011a). En Chile, el reservorio natural predominante de ANDV es *Oligoryzomys longicaudatus*, comúnmente conocido como ratón colilargo, que se distribuye desde la III Región hacia el sur (Castillo H. & Ossa A., 2002).

Los casos de SCPH han ocurrido en un amplio rango geográfico, que abarca desde la región de Valparaíso (32-33°S) a la región de Aysén (46°S), siendo la principal región afectada es la región del Bio-Bío, seguida de las regiones de Los Lagos y la Araucanía. Debido a la inexistencia de medicamentos, antídotos o vacunas para el tratamiento o prevención del síndrome causado por el hantavirus en Chile, la única ayuda que es posible brindar a pacientes infectados es tratamiento de soporte hasta que su sistema inmune sea capaz de combatir al virus u ocurra el deceso.

### **1.3. Tratamientos contra hantavirus**

Actualmente, no existen medicamentos antivirales que permitan curar las infecciones por hantavirus, y el tratamiento se restringe a cuidados paliativos que permita controlar los síntomas hasta que el sistema inmune del paciente finalmente elimine el virus del organismo (Enria et al., 2001; Jonsson et al., 2008; Manigold & Vial, 2014; Muranyi, 2005). Tratamientos con Ribavirina (1-β-D-ribofuranosyl-1,2,4-triazole-3-carboxamide), un análogo de guanosina, ha demostrado actividad antiviral contra hantavirus que ocasionan FHSR. Sin embargo, los resultados de pruebas en pacientes con SCPH fueron inconcluyentes (Jonsson et al., 2010; Larke et al., 2015; Muranyi, 2005; Szabó, 2017). Además, la respuesta al tratamiento con Ribavirina depende de la fase y severidad del FHSR en que sea administrado el fármaco (Battisti et al., 2011; Safronetz et al., 2011).

La administración de anticuerpos neutralizantes humanos durante la fase aguda de SCPH puede ser eficaz para el tratamiento y/o profilaxis de las infecciones por hantavirus (Manigold & Vial, 2014; Szabó, 2017; Vial et al., 2015). Se ha encontrado que el título de anticuerpos neutralizantes en pacientes es inversamente proporcional a la gravedad de la patología (Bharadwaj et al., 2000; Borges et al., 2006). Estudios en ratones, ratas, hámsteres y monos han indicado que la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales neutralizantes o sueros policlonales puede proteger pasivamente animales del desafío con el mismo virus (Custer et al., 2003; Haese et al., 2015; J. W. Hooper et al., 2008; Jiao et al., 2014; Klingström et al., 2008; Krüger et al., 2011; Szabó, 2017). Del mismo modo, hámsteres tratados con el plasma inmune de pacientes infectados con ANDV y ratones ciervo tratados con plasma de pacientes infectados con el virus Sin Nombre (SNV) fueron protegidos contra la exposición al virus homólogo (Jonsson et al., 2008).

De esta forma, en los últimos años, diversos grupos han trabajado en la búsqueda de tratamientos, principalmente basados en el empleo de anticuerpos neutralizantes (R. Brocato et al., 2012; Custer et al., 2003; Garrido et al., 2018; Haese et al., 2015; Jiao et al., 2014; Larke et al., 2015; Vial et al., 2015; Xu et al., 2002). Sin embargo, se debe tener en consideración el estrecho margen de tiempo en que la aplicación de estos tratamiento pudiese ser efectivo. Hasta ahora, los resultados sugieren que estos tratamientos de este tipo sólo son efectivos al ser administrados durante la fase prodrómica de la enfermedad.

#### **1.4. Desarrollo de vacunas**

El desarrollo de las vacunas constituye uno de los mayores éxitos en la historia de la medicina (Koff et al., 2013). Aunque las vacunas han reducido drásticamente la morbilidad y mortalidad asociada a diversas enfermedades infecciosas (Leclerc, 2003), aún existen patógenos contra los cuales no se ha logrado obtener vacunas. En la búsqueda de vacunas contra estos patógenos o para mejorar las ya existentes, se han empleado diversas estrategias. Entre ellas se pueden nombrar el uso de nuevos antígenos, el desarrollo de adyuvantes más potentes y de mejores sistemas de presentación antigénica (Oñate et al., 2020), así como perfeccionamiento en las formas de administración de vacunas.

##### **1.4.1. Estrategias en el desarrollo de antígenos**

Desde el desarrollo de las primeras vacunas, se han empleado antígenos de diversa naturaleza buscando una respuesta inmune protectora y al mismo tiempo minimizar reacciones adversas y peligros potenciales. Así, podemos encontrar vacunas de patógenos completos, vacunas de subunidades y vacunas de ácidos nucleicos (NIH, 2019).

Las vacunas basadas en patógenos completos han sido las mayormente utilizadas. Estas vacunas contienen al microorganismo inactivado (vacunas de microorganismos muertos) o atenuados (vacunas de microorganismos vivos atenuados) por métodos químicos o físicos (Koff et al., 2013; Serruto & Rappuoli, 2006). A pesar de su eficacia, estas estrategias actualmente no son muy usadas en nuevas vacunas por la dificultad de cumplir estándares de seguridad y calidad que permitan que agencias regulatorias aprueben su empleo en seres humanos (Cordeiro & Alonso, 2016). Al día de hoy, se emplean técnicas modernas para la construcción de viriones seudotipados o quiméricos.

Estos viriones seudotipados permiten usar la estructura de un virus y expresar en su superficie las proteínas superficiales de otro. Los viriones pueden posteriormente ser inactivados o bien ser desde su diseño incompetentes para la replicación (Frey et al., 2018). De esta forma, se mantiene la potencia y se minimizan los riesgos relacionados a vacunas de microorganismos muertos o vivos atenuados.

Las vacunas de subunidades, en las cuales se emplean como antígenos porciones purificadas del patógeno permiten subsanar los potenciales riesgos al uso y/o manipulación de microorganismos infecciosos. Los antígenos usados en vacunas de subunidades han sido principalmente proteínas y polisacáridos. De estas últimas, debido a su baja inmunogenicidad, han surgido las vacunas conjugadas. En ellas, polisacáridos o péptidos son conjugados a una proteína altamente inmunogénica, buscando mejorar la respuesta inmune contra el polisacárido o péptido (Frey et al., 2018; Levine & Sztein, 2004). También se están evaluando otras alternativas para su uso como “transportadores” de antígenos (Eskandari et al., 2017; Vartak & Sucheck, 2016). Por otra parte, entre las vacunas de subunidades basadas en proteínas, podemos encontrar las vacunas toxoides (que contienen toxinas proteicas inactivadas), vacunas de subunidades recombinantes (en que las proteínas usadas como antígenos son expresadas en sistemas recombinantes) y partículas tipo virus (VLP; *Virus-Like Particles*) en las cuales la expresión de las proteínas externas de algunos virus forman estructuras tipo virus (Frey et al., 2018; Nascimento & Leite, 2012). El desarrollo de herramientas bioinformáticas también ha avanzado en la predicción de epítopes B y T desde secuencias y/o estructuras de proteínas, lo que sumado al conocimiento empírico en el área, ha permitido el desarrollo experimental de vacunas basadas en estos epítopes (Serruto & Rappuoli, 2006).

Las vacunas de ácidos nucleicos son un gran avance experimental en el área de la vacunología. A través de la vacunación, se introduce material genético que codifica para el antígeno o antígenos contra los cuales se busca una respuesta inmune. Las células del cuerpo usan este material genético para producir los antígenos. Las potenciales ventajas de este enfoque incluyen la estimulación de respuestas inmunitarias a largo plazo, estabilidad de la vacuna y relativa facilidad de fabricación a gran escala (Iavarone et al., 2017; Pardi et al., 2018; Ulmer & Geall, 2016). Muchas de estas vacunas están en proceso de investigación, aunque ninguna está actualmente autorizada para uso humano (FDA, 2020).

#### 1.4.2. Adyuvantes

Los adyuvantes son sustancias que permiten aumentar la potencia, mantener y modular la respuesta inmune originada contra el o los antígenos con los que son formulados. En general, las vacunas basadas en microorganismos completos no necesitan de la co-administración de adyuvantes para lograr una respuesta inmune potente y de memoria a largo plazo. Sin embargo, las vacunas de subunidades en general presentan inmunogenicidad más limitada, por lo que se requiere el uso de adyuvantes (Chan et al., 2017; Reed et al., 2009). Distintos adyuvantes (o formulaciones de adyuvantes) son capaces de potenciar la respuesta inmune a través de distintos mecanismos (Del Giudice et al., 2018). Estos mecanismos incluyen la formación de depósitos de antígenos, aumento de la presentación de antígenos por células dendríticas (DC; *Dendritic cells*) activadas y la inducción de respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTL; *Cytotoxic T Lymphocytes*) y/o respuesta de linfocitos T ayudadores (Th; *T-helper lymphocytes*), ya sea Th1 o Th2 (Reed et al., 2009).

A la fecha, existen limitados adyuvantes cuyo uso ha sido aprobado en seres humanos. Entre ellos, se pueden nombrar adyuvantes basados en sales de aluminio, MF59® (emulsión aceite en agua), MLP® (glicolípido), VLP, Virosomas inmunopotenciadores reconstituidos de Influenza (IRIV; *Immunopotentiating Reconstituted Influenza Virosomes*) y la toxina del cólera (Chan et al., 2017; Knudsen et al., 2016; Reed et al., 2009). Los adyuvantes basados en aluminio son los adyuvantes más empleados en vacunas de seres humanos (Chan et al., 2017; Mbow et al., 2011). Estos adyuvantes promueven una potente respuesta inmune de anticuerpos (Respuesta Th2) (Del Giudice et al., 2018). Si bien aún se desconoce completamente su mecanismo de acción, los mecanismos propuestos hasta el momento incluyen un efecto de depósito, la generación de respuesta inflamatoria que recluta células presentadoras de antígeno, la activación del inflammasoma NLRP3, la liberación de ADN de la muerte celular que causa el reconocimiento del patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs; *Danger-Associated Molecule Pattern*) y mejorar la fagocitosis de antígenos por las células presentadoras de antígeno (Chan et al., 2017; Del Giudice et al., 2018; Marrack et al., 2009; Mbow et al., 2011; Reed et al., 2009).

Otros adyuvantes, a pesar de ser altamente inmunopotenciadores, no son empleados en vacunas para seres humanos debido a su elevada toxicidad. Este es el caso de algunos de los adyuvantes más empleados en investigación; el Adyuvante Completo de Freund (ACF) y el Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) (Chang et al., 1998; O'Hagan et al., 2013). Estos adyuvantes se caracterizan por generar una potente respuesta inmune celular (Th1), por lo que es ampliamente empleada a nivel investigativo para comparar perfiles de respuesta a un mismo antígeno empleando distintos adyuvantes (Chang et al., 1998).

#### **1.4.3. Vías de administración**

Además de los factores mencionados anteriormente, la selección de la vía de administración de la vacuna también es crucial y ha demostrado una gran influencia sobre el tipo y la fuerza de la respuesta inmune que se produce (Mohan et al., 2010) además de en la aparición de efectos adversos. Las vías de administración clásicas de vacunas son vías parenterales (subcutánea, intradérmica, intramuscular, etc.) (Lambricht et al., 2017). De ellas, las rutas más empleadas son la intramuscular y la subcutánea (Hickling et al., 2011). Para cada formulación vacunal debería evaluarse las mejores rutas de administración basados en las características del antígeno y adyuvantes presentes en la vacuna (Laurichesse et al., 2007; Ruben et al., 2001; Shaw et al., 1989), teniendo en cuenta diferencias tanto en la respuesta inmune generada como en la aparición de efectos adversos locales relacionados con la vía de administración.

#### **1.5. Vacunas contra SCPH**

Se han hecho esfuerzos en desarrollar vacunas profilácticas utilizando variadas técnicas, que abarcan desde viriones inactivados hasta técnicas de ADN recombinante (Bi et al., 2008; Brown et al., 2011; Hjelle, 2002; Hooper et al., 2002; Hooper et al., 2006, 2013; Krüger et al., 2001, 2011; Lee et al., 2006; Maes et al., 2009; Prescott et al., 2014; Schmaljohn, 2009). Sin embargo, en la actualidad no hay vacunas contra FHSR aprobadas para su uso en Europa, y no existen estudios clínicos reportados ni intentos de obtener licencias para autorizar las vacunas asiáticas (Hjelle, 2002; Kruger et al., 2015; Krüger et al., 2001; Schmaljohn, 2012). De la misma forma, no existen vacunas aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) contra hantavirus causantes de SCPH (Jonsson et al., 2008; Larke et al., 2015; Szabó, 2017).

Un obstáculo importante en el desarrollo de medidas médicas eficaces contra *Hantavirus* es no contar con un modelo animal confiable que recapitule la enfermedad observada en humanos. Hasta la fecha, el único modelo animal que muestra la sintomatología de SCPH es el hámster sirio (*Mesocricetus auratus*) (Hooper et al., 2001, 2013; Milazzo et al., 2002; Safronetz et al., 2012; Zivcec et al., 2011a). En el caso del virus Andes, después de la infección los hámsteres desarrollan SCPH como una enfermedad que imita fielmente la condición humana con respecto al período de incubación, la fisiopatología y la rápida aparición de insuficiencia respiratoria severa (Safronetz et al., 2012). Desde la caracterización del modelo, este se ha convertido en la plataforma de estudio de vacunas contra virus Andes.

### **1.5.1. Vacunas contra SCPH en estado experimental**

Se han utilizado distintas aproximaciones para el desarrollo de vacunas contra SCPH. Esta búsqueda se ha centrado principalmente en el uso de técnicas recombinantes para la obtención de candidatos vacunales contra el virus Sin Nombre o el virus Andes. La mayoría de estas investigaciones se han basado en la capacidad de las glicoproteínas Gn y Gc, las únicas proteínas expuestas en la superficie del virus, de generar anticuerpos neutralizantes, aunque también existen aproximaciones basadas en la Nucleoproteína (Brocato & Hooper, 2019).

El uso de viriones pseudotipados con las glicoproteínas de superficie de hantavirus han demostrado buenos resultados en cuanto a la protección de hámsteres sirios en el desarrollo de la patología en ensayos de desafío (Brown et al., 2011; Prescott et al., 2014; D. Safronetz et al., 2009). Sin embargo, no se han visto mayores avances en este ámbito que sugieran su utilización como candidato vacunal en seres humanos.

Se ha explorado el empleo de la Nucleoproteína como candidato vacunal. Para esto, se ha evaluado la antigenicidad e inmunogenicidad de Nucleoproteínas recombinantes (De Carvalho Nicacio et al., 2002). Ensayos de desafío en hámsteres sirios demuestran una protección a corto plazo, pero no sostenida en el tiempo (Martinez & Padula, 2012). No se han desarrollado nuevos avances en este ámbito desde las publicaciones originales.

El candidato vacunal contra SCPH más avanzado actualmente corresponde a una vacuna de ADN que contiene el segmento M de virus Andes (Hooper et al., 2002). De esta forma, la vacunación permite la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en los individuos vacunados.

Este candidato vacunal ha demostrado la capacidad de generar anticuerpos contra las glicoproteínas en distintas especies, pero no en hámsteres sirios. Aún así, la transferencia pasiva de anticuerpos obtenidos desde otras especies inmunizadas con el candidato vacunal de ADN son capaces de proteger hámsteres sirios en ensayos de desafío (Brocato et al., 2012; Custer et al., 2003; Haese et al., 2015; Hooper et al., 2002; Jiao et al., 2014). Actualmente, se está realizando un ensayo clínico de fase I con el candidato vacunal de ADN basado en el segmento M de virus Andes (NCT03682107).

La tabla I1 resume las principales aproximaciones experimentales que se han desarrollado en la búsqueda de candidatos vacunales contra SCPH.

**Tabla I1: Principales candidatos vacunales contra SCPH en investigación.**

PUUV-N: Nucleoproteína de virus Puumala; ANDV-N: Nucleoproteína de virus Andes, DOBV-N: Nucleoproteína de virus Dobrava-Belgrado, ANDV: Virus Andes; Ad: Adenovirus; VSV: Virus de la Estomatitis Vesicular. (Modificado desde Brocato y Hooper, 2019).

<b>Candidato Vacunal</b>	<b>Tipo de Vacuna</b>	<b>Fecha desde la última publicación</b>
PUUV-N, ANDV-N, DOBV-N (Suiza)	Nucleoproteína Recombinante	2002
Viriones Pesudotipados Ad-ANDV (EE.UU)	Viriones Pesudotipados Recombinantes	2009
Viriones Pesudotipados VSV-ANDV (EE.UU)	Viriones Pesudotipados Recombinantes	2011
ANDV-N (Argentina)	Nucleoproteína Recombinante	2012
ANDV ADN (PharmaJet Stratis®, EE.UU)	Basada en ácidos nucleicos	En ensayos clínicos fase I (16-0119, NTCT03682107)



## 1.6. Producción de proteínas recombinantes

El desarrollo de la tecnología de ADN recombinante ha permitido emplear distintos sistemas, tanto procariotas como eucariotas, para la producción de proteínas de interés biofarmacéutico en un proceso relativamente barato. Para la elección del sistema de expresión a utilizar se deben tomar en cuenta diversos factores, como la productividad, bioactividad, las características físico-químicas de la proteína de interés, así como el costo, la conveniencia y la seguridad del sistema en sí (Yin et al., 2007). Entre los sistemas más frecuentemente utilizados encontramos las células procariotas, de levaduras, de insectos, de mamíferos así como en individuos eucariotas.

La profunda caracterización genética y fisiológica, el tiempo de generación corto, la facilidad de manejo, el proceso de fermentación establecido y la gran capacidad de acumulación de proteínas heterólogas, de más del 20% del contenido total de proteínas celulares, han convertido a *E. coli* el más utilizado de todos los organismos procariotas para la producción de proteínas recombinantes (Schmidt, 2004). Además de cepas de *E. coli* acondicionadas, otras especies han sido utilizadas como alternativas para la producción de proteínas recombinantes, tales como *Bacillus megaterium*, *B. subtilis*, *Ralstonia eutropha* y *Staphylococcus carnosus*, entre otras (Demain & Vaishnav, 2011). Sin embargo, el potencial y la capacidad de las bacterias para realizar modificaciones post-traduccionales parece ser muy limitado, y el conocimiento de sus vías es bastante escaso. Es por esto que el empleo de la mayoría de los procariotas conocidos generalmente se limita a la producción de las proteínas que no están glicosiladas de forma natural o a proteínas glicosiladas que son farmacológicamente activa también sin glicosilación (Schmidt, 2004).

Como las bacterias, las levaduras pueden crecer rápidamente y a bajo costo, además de alcanzar alta densidad celular en fermentador. Además de poseer vías de modificación post-traduccionales más complejas, ofrecen la ventaja de no ser pirogénicas ni patogénicas y ser capaces de secretar de manera más eficiente (Schmidt, 2004). Los dos principales sistemas utilizados son *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura metilotrófica *Pichia pastoris* (Andersen & Krummen, 2002; Demain & Vaishnav, 2011). Las levaduras metilotróficas se han convertido en alternativas muy atractivas como huéspedes para la producción industrial de proteínas recombinantes, ya que los promotores que controlan la expresión de estos genes se encuentran entre los promotores más fuertes y más estrictamente regulados de las levaduras. Además, usualmente *Pichia* logra un mejor rendimiento que células de insecto o células de mamífero.

Sin embargo, existen desventajas en la utilización de *Pichia* como un huésped para la expresión heteróloga, tales como la incapacidad de producir chaperonas necesarias para el correcto plegamiento de algunas proteínas y seguir un patrón de glicosilación distinto al de células de mamíferos, si bien menos extensivo que el de *S. cerevisiae* (Demain & Vaishnav, 2011).

Los hongos filamentosos son capaces de llevar a cabo modificaciones post-traduccionales más complejas que las levaduras (Schmidt, 2004) y, como ellas, son capaces de producir y secretar grandes cantidades de proteínas heterólogas. Además, miembros del género *Aspergillus* han sido utilizados durante largo tiempo, por lo que son consideradas seguras (Yin et al., 2007). Sin embargo, en muchos casos no ha sido posible lograr la expresión de cantidades considerables de proteínas heterólogas (Demain & Vaishnav, 2011; Schmidt, 2004; Yin et al., 2007), y algunas veces la producción se ve severamente perjudicada por la acción de proteasas (Demain & Vaishnav, 2011).

Las células de insecto pueden realizar modificaciones post-traduccionales más complejas que hongos, y poseen una mejor maquinaria para el plegamiento de proteínas. El vector más utilizado es el de baculovirus, permitiendo una producción eficiente de proteínas heterólogas al infectar insectos o líneas celulares de insecto. Además, el cultivo de células de insecto es más económico que el de células de mamífero.

Una gran desventaja del sistema es que una vez infectadas, las células hospederas morirán, por lo que el gen heterólogo no puede ser expresado continuamente (Schmidt, 2004; Yin et al., 2007), y su cultivo requiere la utilización de inhibidores de proteasas. Adicionalmente, las células de mamífero y las células de insecto difieren en su patrón de glicosilación, que puede ser inmunogénico (Yin et al., 2007).

Los sistemas de expresión en células de mamífero son los más utilizados para la producción de proteínas que requieren de modificaciones post-traduccionales complejas, y son ventajosos frente a otros sistemas debido a que permiten obtener proteínas correctamente plegadas y glicosiladas. Sin embargo, son secretores más pobres, la mantención de las células es más costosa y requieren comprobar la ausencia de virus en sus productos. Aún así, son los sistemas más utilizados por la industria biofarmacéutica para la producción de glicoproteínas y anticuerpos (Andersen & Krummen, 2002; Yin et al., 2007).

Se han utilizado animales transgénicos para la expresión de proteínas recombinantes en leche, clara de huevo, sangre, orina, plasma seminal y capullos de gusanos de seda, siendo leche y orina las mejores hasta ahora.

Algunas de las especies empleadas incluyen cabras, vacas, ratones, conejos, cerdos y ovejas. A pesar de las grandes ventajas de este sistema, como las elevadas cantidades de proteína que se pueden producir anualmente y la capacidad de producir glicoproteínas complejas correctamente plegadas y glicosiladas, se debe tener en cuenta las dificultades de generar animales transgénicos capaces de producir altas concentraciones de la proteína de interés y el periodo de tiempo que se necesita para alcanzar los niveles de producción (Demain & Vaishnav, 2011).

En comparación a los sistemas de animales vivos y de células animales, los sistemas de expresión de proteínas recombinantes en plantas son más seguros, menos costosos y requieren menor tiempo de desarrollo. Presentan un bajo riesgo de contaminación con patógenos animales y son de fácil escalado. Sin embargo, no han sido tan extensamente estudiados como otros sistemas de producción de proteínas recombinantes y se deben considerar posibles contaminaciones con pesticidas, herbicidas y metabolitos tóxicos de plantas.

### **1.7. Propuesta de investigación**

El síndrome cardiopulmonar por hantavirus (SCPH) es una enfermedad de elevada mortalidad y que afecta extensamente a nuestro país, siendo nuestra región la principal afectada. Actualmente, no existen vacunas ni tratamientos contra esta patología, y sólo es posible entregar cuidados paliativos a los afectados. Las glicoproteínas de superficie del virus Andes, Gn y Gc, son un buen blanco para la generación de vacunas y tratamientos. Además, el virus Andes, agente etiológico del SCPH en nuestro país, cuenta con un modelo animal, el hámster sirio, que permitiría realizar las pruebas necesarias para la generación de vacunas y tratamientos. Hasta la fecha, se han descrito múltiples sistemas que permiten la expresión de glicoproteínas complejas en altos niveles, capaces de ser adaptados para llevar la producción de estas proteínas a nivel industrial. A través de este trabajo, buscamos desarrollar un candidato vacunal recombinante basado en las glicoproteínas Gn y Gc de la superficie del virus Andes. Para ello, se diseñaron distintos antígenos, los que de acuerdo a sus características fueron expresados en distintos sistemas. Los antígenos fueron purificados y caracterizados molecularmente, y posteriormente fueron utilizados para inmunizar hámsteres sirios con el fin de caracterizar la respuesta inmune celular y humoral inducida por distintas formulaciones de los antígenos. Nuestros resultados consisten un avance significativo hacia la generación de una vacuna contra SCPH causado por virus Andes.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Antígenos derivados de las glicoproteínas de superficie del virus Andes, producidos por vías recombinantes, son capaces de inducir una respuesta inmune específica contra virus Andes en hámsteres sirios.



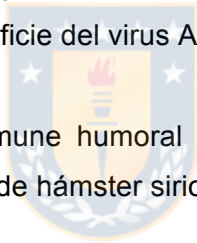
## OBJETIVOS DEL TRABAJO

### Objetivo General:

Desarrollar un candidato vacunal recombinante de subunidades, basado en las glicoproteínas de superficie del virus Andes, capaz de generar una respuesta inmune específica contra virus Andes en hámsteres sirios.

### Objetivos Específicos:

- I. Diseñar, expresar y purificar las moléculas recombinantes basadas en las glicoproteínas de superficie del virus Andes.
- II. Caracterizar molecular y antigénicamente las moléculas recombinantes basadas en las glicoproteínas de superficie del virus Andes.
- III. Caracterizar la respuesta inmune humoral y celular inducida por los antígenos recombinantes en un modelo de hámster sirio.



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Materiales

#### 2.1.1. Medios de cultivo

##### 2.1.1.1. Medios de cultivo de bacterias

- **Agar Luria Bertani (Agar-LB)** (MoBio, EE.UU.)
- **Medio Luria Bertani (LB):** Triptona 1.0% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), Extracto de levadura 0.5% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), NaCl 1.0% (p/v) (Merck, Alemania), pH 7,5.
- **Medio Terrific Broth (TB):** Triptona 1.2% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), Extracto de levadura 2.4% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), Glicerol 0.5% (v/v) (Merck, Alemania),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  17 mM (Merck, Alemania),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  72 mM (Merck, Alemania), pH 7,5.
- **Medio Super Broth (SB):** Triptona 3.5% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), Extracto de levadura 2.0% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), NaCl 0.5% (p/v) (Merck, Alemania), NaOH 1 N 5 mL/L (Merck, Alemania), pH 7,5.
- **Medio 2xYT:** Triptona 1.6% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), Extracto de levadura 1.0% (p/v) (BD Biosciences, EE.UU.), NaCl 0.5% (p/v) (Merck, Alemania), pH 7,5.
- **Aditivos de medios de cultivo de bacterias:**
  - Etanol: 1.0%, 2.0%, 3.0% (v/v) (Merck, Alemania)
  - Glicerol: 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v) (Merck, Alemania)
  - Sorbitol: 0.3 M, 0.6 M, 1.0 M (Merck, Alemania)
  - Sacarosa: 1.0%, 3.0%, 5.0% (v/v) (Merck, Alemania)
  - Glucosa: 2.5%, 5.0%, 10.0% (v/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.)
  - DTT: 2.5 mM, 5.0 mM, 10.0 mM (Merck, Alemania)
  - $\text{MgSO}_4$ : 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM (Sigma-Aldrich, EE.UU.)
  - $\text{CaCl}_2$ : 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM (Merck, Alemania)
  - $\text{FeCl}_3$ : 0.05 mM, 0.1 mM, 0.2 mM (Merck, Alemania)

### 2.1.1.2. Medios de cultivo de levaduras

- **Medio YP:** Extracto de levadura 10 g/L (BD Biosciences, EE.UU.); Peptona 20 g/L (BD Biosciences, EE.UU.).
- **Medio YPD:** Medio YP suplementado con D-glucosa 2% (Life Technologies, EE.UU.).
- **Medio YPG:** Medio YP suplementado con glicerol 2% (Life Technologies, EE.UU.).
- **Medio Yeast Nitrogen Base (YNB)** (US Biological Life Sciences, EE.UU.).
- **Agar YPD:** Medio YPD suplementado con Agar 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- **Agar YNB:** Medio YNB suplementado con Agar 0,1% (p/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- **YPD/HEPES:** Medio YPD suplementado con HEPES 170 mM pH 8,0 (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- **Otros aditivos de medios de cultivo de levaduras:**
  - Metanol 0,5%, 0,75%, 1% (v/v) (Merck, Alemania).

### 2.1.1.3. Medios de cultivo de células de mamíferos

- **Medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*):** D-glucosa 4,5 g/L (Life Technologies, EE.UU.);  $\text{NaHCO}_3$  3,7 g/L (Life Technologies, EE.UU.), suplementado con L-glutamina 0,3 mg/mL (Life Technologies, EE.UU.), Piruvato sódico 1 mM (Life Technologies, EE.UU.) y solución antibiótico-antimicótico 1X (Life Technologies, EE.UU.).
- **Medio de crecimiento:** DMEM suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (Life Technologies, EE.UU.).
- **Medio de congelación:** DMEM suplementado con 40% (v/v) de SFB (Life Technologies, EE.UU.) y 10% (v/v) Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, EE.UU.).
- **Otras soluciones empleadas en cultivo celular:**
  - **Tampón fosfato salino** (PBS; *Phosphate-Buffered Saline*) (Thermo Scientific, EE.UU.).
  - **Tripsina-EDTA 0,25%** (Life Technologies, EE.UU.).
  - **Azul de Tripán:** Azul de Tripán 5 g/L (Sigma, EE.UU.), NaCl 8,5 g/L (Merck, Alemania).
  - **Polietilenimina (PEI)** 25 kDa (Sigma, EE.UU.).

- **Solución RIPA:** NaCl 150 mM (Merck, Alemania), Tritón X-100 1% (v/v) (Merck, Alemania), deoxicolato de sodio 0,5% (p/v) (Merck, Alemania), SDS 0,1% (p/v) (Calbiochem, Inglaterra), Tris 50 mM pH 8.0 (Calbiochem, Inglaterra), Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0,5 mM (Merck, Alemania).

## 2.1.2. Antibióticos

- **Ampicilina (Amp)** (US Biological Life Sciences, EE.UU.)
- **Cloranfenicol (Cam)** (Merck, Alemania)
- **Estreptomicina (Str)** (Merck, Alemania)
- **Kanamicina (Kan)** (Merck, Alemania)
- **Zeocina (Zeo)** (Invivogen, EE.UU.)
- **G418 (Geneticina)** (Invivogen, EE.UU.).

## 2.1.3. Células

### 2.1.3.1. Cepas Bacterianas

- **Top 10 (Life Technologies, EE.UU.):** F-mcrAΔ (mrr-hsdRMS- mcr BC) ϕ80 lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139Δ (ara- leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG.

Cepa de *Escherichia coli* empleada para la replicación de vectores plasmídicos debido a su alta eficiencia de transformación.

- **BJ5183 (Agilent Technologies, EE.UU.):** endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR [Strr].

Cepa de *E. coli* que permite generar vectores adenovirales conteniendo un gen de interés. Suministran los componentes necesarios para ejecutar un evento de recombinación entre el vector pAdEasy-1 y un vector AdEasy que contiene el gen de interés, generando así un genoma de adenovirus recombinante con el gen de interés.

- **BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene, EE. UU.):** E. coli B F- ompT hsdS(rB- mB dcm+ Tetr gal λ(DE3) endA Hte [argU ileY leuW CamR].

Cepa de *E. coli* empleada para la expresión de proteínas heterólogas. Posee dentro de su genoma el gen codificante para la T7 ARN polimerasa, cuya expresión se encuentra controlada por el promotor lac inducible por IPTG.



- **SHuffle® T7 Express Competent E. coli (Neb, EE. UU.):** fhuA2 lacZ: T7 gene1 [lon] ompT ahpC gal  $\lambda$ att:pNEB3-r1-cDsbC (SpecR, lacIq)  $\Delta$ trxB sulA11 R(mcr-73:miniTn10-TetS)<sup>2</sup> [dcm] R(zgb-210:Tn10-TetS) endA1  $\Delta$ gor  $\Delta$ (mcrC-mrr)114:IS10.

Cepa de *E. coli* empleada para la expresión de proteínas heterólogas, con capacidad de permitir la formación de enlaces disulfuro. Posee dentro de su genoma el gen codificante para la T7 ARN polimerasa, cuya expresión se encuentra controlada por el promotor T7 inducible por IPTG.

#### 2.1.3.2. Levaduras

- **MP36:** Cepa de la levadura metilotrófica *Pichia pastoris (Komagataella phafi)*, utilizada para la expresión de proteínas recombinantes bajo control del promotor inducible por metanol AOX1. Contiene una mutación *his-*, que impide su crecimiento en medio carente de histidina.

#### 2.1.3.3. Líneas de células de mamíferos

- **HEK-293 (ATCC® CRL-1573™, EE.UU.):** Línea celular derivada de células de riñón embrionario humano modificadas genéticamente con la región E1 del adenovirus tipo 5 en el cromosoma 19 (Graham et al., 1977).
- **HEK-293FT (Thermo Scientific, EE.UU. act. R700-07):** Línea celular derivada de la línea HEK-293T optimizada para la producción de lentivirus. Estas células expresan de manera constitutiva el antígeno T del virus de SV40.
- **HEK-293-i $\beta$ 3:** Línea celular generada en el laboratorio, derivada de HEK-293. Expresa de manera estable integrina  $\beta$ 3 (i $\beta$ 3).
- **SiHa (ATCC® HTB-35™, EE.UU.):** Línea derivada de células de cáncer cervicouterino infectadas con virus de papiloma humano variante 16 (VPH-16), conteniendo cada genoma celular una copia de los genes del virus.

#### 2.1.4. Plásmidos

- **pAdTrack-CMV:** Vector perteneciente al kit AdEasy™ Adenoviral Vector System (Quantum Biotechnologies, EE.UU.), empleado en el clonaje de genes por recombinación homóloga en el genoma del adenovirus tipo 5 humano. Contiene el gen de la Proteína Fluorescente Verde (*Green Fluorescent Protein; GFP*), que permite monitorear la infección viral.

- **pAdEasy 1:** Vector perteneciente al kit AdEasy™ Adenoviral Vector System (Quantum Biotechnologies, EE.UU.), el cual contiene toda la información viral del genoma del adenovirus tipo 5 humano con eliminaciones en las regiones E1 y E3. Es empleado para generar un nuevo plásmido mediante recombinación homóloga en bacterias, quedando el gen de interés insertado en la región E1 del genoma adenoviral.
- **pCBBhis3:** Vector desarrollado en nuestro laboratorio para la expresión de proteínas recombinantes, bajo control del promotor inducible por metanol AOX1, en *P. pastoris*. Cuenta con un cassette para la expresión del gen His3, que complementa la mutación *his-* de la cepa MP36, permitiendo la selección por auxotrofia de los clones establemente transformados.
- **pCBB-Gns:** Vector utilizado para la expresión del antígeno recombinante Gns en *P. pastoris*. Contiene la secuencia codificante del antígeno recombinante Gn inserta en el vector pCBBhis3 desarrollado en nuestro laboratorio para la expresión de proteínas recombinantes, bajo control del promotor inducible por metanol AOX1. Cuenta con un cassette para la expresión del gen His3, que complementa la mutación *his-* de la cepa MP36, permitiendo la selección por auxotrofia de los clones establemente transformados.
- **pCBBz:** Vector desarrollado en nuestro laboratorio para la expresión de proteínas recombinantes, bajo control del promotor inducible por metanol AOX1, en *P. pastoris*. Cuenta con el gen BleoR de *Streptoalloteichus hindustanus*, que funciona como marcador de resistencia a zeocina para la selección de clones establemente transformados.
- **pCBBz-Gcs:** Vector utilizado para la expresión del antígeno recombinante Gcs en *P. pastoris*. Contiene la secuencia codificante para el antígeno recombinante Gc insertada en del vector pCBBz, desarrollado en nuestro laboratorio para la expresión de proteínas recombinantes, bajo control del promotor inducible por metanol AOX1. Cuenta con el gen BleoR de *Streptoalloteichus hindustanus*, que funciona como marcador de resistencia a zeocina para la selección de clones establemente transformados.

- **pET-22b(+)**: Vector desarrollado para la expresión de proteínas heterólogas en *E. coli*, bajo el control del promotor de T7 ARN polimerasa. Contiene la secuencia codificante para la señal de secreción al periplasma pelB (Novagen, EE.UU.). Utilizado como control negativo de la expresión del antígeno recombinante AndesVac.
- **pET-22b(+)-AndesVac**: Vector utilizado para la expresión en *E. coli* del antígeno AndesVac en, bajo el control del promotor de T7 ARN polimerasa. Contiene el gen de interés para la expresión del antígeno AndesVac, con la secuencia de codones optimizada para su expresión en bacterias. Contiene la secuencia codificante para la señal de secreción al periplasma pelB (Novagen, EE.UU.).
- **pEntry-GPC**: Vector utilizado para la expresión en células de mamíferos de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes, bajo el control del promotor de Citomegalovirus (CMV). Vector empleado para la generación de vectores lentivirales pseudotipados con las glicoproteínas de superficie de virus Andes. Contiene la secuencia que codifica para el precursor de las glicoproteínas (GPC) de virus Andes, proveniente del segmento M de la cepa de virus Andes Chile-9717869 (GenBank: AF291703.2), con optimización de codones para su expresión en células de mamíferos.
- **pENTRY-FSH**: Vector utilizado como control de transfección de células de mamíferos. Contiene las secuencias codificantes para la expresión en células de mamíferos de FSH seguido de una secuencia IRES y la secuencia para la proteína eGFP, bajo control del promotor de CMV.
- **pLGW**: Vector utilizado como control de transducción de los vectores lentivirales. Permite la expresión del gen reportero eGFP bajo control del promotor de CMV en células transducidas con los vectores lentivirales que empaquetan este vector.
- **pLP1**: Vector perteneciente al kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen, EE.UU.) para la producción de vectores lentivirales. Contiene los genes *Gag* y *Pol*.
- **pLP2**: Vector perteneciente al kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen, EE.UU.) para la producción de vectores lentivirales. Contiene el gen *Rev*.

- **pLP/VSVG:** Vector perteneciente al kit ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen, EE.UU.) para la producción de vectores lentivirales. Permite la expresión de la proteína G del virus de la Estomatitis Vesicular en la superficie de los vectores lentivirales.

#### 2.1.5. Enzimas de restricción y modificación

- **Endonucleasas de restricción *EcoRV*, *BamHI*, *BglII*, *Fspl*, *MscI*, *NcoI*, *NdeI*, *NgoMIV*, *PacI*, *PmeI*, *PvuII*, *SmaI*, *XbaI* y *XhoI*, de New England Biolabs (Inglaterra)**, utilizadas según las recomendaciones de los fabricantes.
- **Enzimas de modificación T4 Ligasa, Fosfatasa Antártica y PNGasa-F, de New England Biolabs (Inglaterra)**, utilizadas según las recomendaciones de los fabricantes.

#### 2.1.6. Anticuerpos

- Anticuerpo monoclonal murino anti-polihistidina (GenScript, China) (Cat: A00186-100).
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con la sonda fluorescente AlexaFluor® (680nm) producido en cabra (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) (Cat: A-21057).
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado a HRP, producido en cabra (GenScript, China.) (Cat: A10096).
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de hámster conjugado a HRP, producido en cabra (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) (Cat: HA6007).
- Anticuerpo monoclonal murino IgG anti-Glicoproteína N de ANDV, clon 6B9/F5 (Austral Biologicals, EE.UU.) (Cat: HNM-6022CX1-5).
- Anticuerpo monoclonal murino IgG anti-Glicoproteína C de ANDV, clon 6C5/D12 (Austral Biologicals, EE.UU.) (Cat: HNM-6023CY1-5).
- Anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Isotiocianato de fluoresceína) producido en cabra (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) (Cat: sc-2356).

### 2.1.7. Animales de experimentación

- **Hámsteres sirios dorados (*Mesocricetus auratus*) hembras, de entre 8 a 10 semanas de edad.** Se emplearon un total de 30 hámsteres, correspondientes a 6 grupos experimentales de 5 hámsteres cada uno.

### 2.1.8. Extracción y purificación de ADN

#### 2.1.8.1. Extracción y purificación de ADN plasmídico de bacterias

- **Solución I:** Glucosa 50 mM (Merck, Alemania), Tris-HCl 25 mM pH 8,0 (Calbiochem, Inglaterra), EDTA 10 mM, pH 8,0 (Calbiochem, Inglaterra), ARNasa 10 mg/mL (US Biologicals, EE.UU.).
- **Solución II:** NaOH 0,2 M (Merck, Alemania), SDS 1% (p/v) (Merck, Alemania).
- **Solución III:** Acetato de potasio 5 M (Merck, Alemania), Ácido acético glacial (Merck, Alemania).
- **Isopropanol** (Merck, Alemania).
- **Fenol/Cloroformo/Alcohol Isoamilico 25:24:1** (Merck, Alemania).
- **Acetato de sodio 3 M, pH 5.2** (Merck, Alemania).
- **Etanol absoluto** (Merck, Alemania).
- **Etanol 70%:** Etanol absoluto 70% v/v (Merck, Alemania) en agua destilada autoclavada.

#### 2.1.8.2. Extracción y purificación de ADN total de levaduras

- **Solución I:** Sorbitol 1 M (Merck, Alemania), EDTA 100 mM, pH 7,5 (Calbiochem, Inglaterra), Zimolasa 10 mg/mL (US Biologicals, EE.UU.).
- **Zimolasa 2,5 mg/mL** (US Biological Life Sciences, EE.UU.).
- **Solución II:** Tris 50 mM pH 7,4 (Calbiochem, Inglaterra); EDTA 20 mM pH 7,4 (Calbiochem, Inglaterra).
- **SDS 10% (p/v)** (Merck, Alemania).
- **Acetato de potasio 5 M** (Merck, Alemania).
- **Isopropanol** (Merck, Alemania).
- **Solución III:** Tris 10 mM pH 7,4 (Calbiochem, Inglaterra); EDTA 1 mM pH 7,4 (Calbiochem, Inglaterra).
- **ARNasa 10 mg/mL** (US Biologicals, EE.UU.).

### 2.1.9. *Dot Blot* de ADN

- **Solución de depuración:** HCl 250 mM (Merck, Alemania).
- **Solución de denaturación:** NaOH 0,5 M (Merck, Alemania), NaCl 1,5 M (Merck, Alemania).
- **Solución de neutralización:** Tris/HCl 0,5 M (Calbiochem, Inglaterra), NaCl 1,5M (Merck, Alemania), pH 7,5.
- **20X SSC:** NaCl 3M (Merck, Alemania), Citrato trisódico di-hidratado ( $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$ ) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) 0,3M, pH 7,0.

### 2.1.10. Electroforesis de ADN

- **Agarosa** (Calbiochem, Inglaterra).
- **Tampón de carga ADN 6X** (New England Biolabs, EE.UU.).
- **Tampón TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X:** 40 mM Tris (Calbiochem, Inglaterra), 1 mM EDTA (Calbiochem, Inglaterra), 20 mM ácido acético (Merck, Alemania).
- **Bromuro de etidio** (Merck, Alemania).
- **Marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA Ladder** (Thermo Fisher Scientific, EE.UU.).
- **Marcador de peso molecular de ADN 1 kb** (New England Biolabs, EE.UU.).

### 2.1.11. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes

- **Gel de poliacrilamida:** Acrilamida/bisacrilamida 30%/1% (p/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Tris/HCl 1.5 M pH 8,8 (Calbiochem, Inglaterra), Tris/HCl 0.5 M pH 6,8 (Calbiochem, Inglaterra), PSA 10% (p/v) (Calbiochem, Inglaterra), SDS 10% (p/v) (Calbiochem, Inglaterra), TEMED (tetrametilendiamina) (Merck, Alemania).
- **Patrón de peso molecular:** AccuRuler RGB PLUS Prestained Protein Ladder 10-245 kDa (MaestroGen, EE.UU.).
- **Tampón de corrida:** Tris/HCl 25 mM (Calbiochem, Inglaterra), Glicina 192 mM (Calbiochem, Inglaterra), SDS 0,1% (p/v) (Calbiochem, Inglaterra).
- **Tampón de carga 6X:** Tris/HCl 0.25 M (Calbiochem, Inglaterra) pH 6,8, SDS 10% (p/v) (Calbiochem, Inglaterra), Glicerol 30% (v/v) (Merck, Alemania), Azul de bromofenol 0,012% (p/v) (Merck, Alemania),  $\beta$ -mercaptoetanol 0,6% (v/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
- **Solución de tinción:** Azul de Coomassie 0,5 g/l (Merck, Alemania), Metanol 10%, (TCL, Chile).

- **Solución de destinción:** Metanol 7% (v/v) (TCL, Chile), Ácido acético 5% (v/v) (Merck, Alemania).

#### 2.1.12. *Dot Blot* de proteínas y *Western Blot*

- **Tampón de transferencia:** Tris-base 48 mM (Merck, Alemania), Glicina 39 mM (Calbiochem, Inglaterra), Metanol 20% (v/v) (Merck, Alemania), SDS 1,3 mM (Merck, Alemania).
- **Membrana:** Membrana de nitrocelulosa para transferencia Amersham Protan 0,2  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare Life Science, Inglaterra).
- **Tampón tris salino (TBS; Tris-Buffered Saline):** 150 mM NaCl (Merck, Alemania), 50 mM Tris (Calbiochem, Inglaterra), pH 7,5.
- **Solución de bloqueo:** Leche descremada 5% (p/v) (Svelty, Nestlé, Suiza), diluida en TBS.
- **Solución de incubación:** Leche descremada 2% (p/v) (Svelty, Nestlé, Suiza), diluida en TBS, adicionado con el anticuerpo a la dilución correspondiente.
- **Solución de lavado:** Tween-20 0.1% (v/v) (Sigma-Aldrich, EEUU) diluido en TBS.
- **Rojo Ponceau:** Rojo Ponceau 0,1% (p/v) (Merck, Alemania) en Ácido Acético 5% (v/v) (Merck, Alemania).

#### 2.1.13. Extracción y solubilización de proteínas

- **Tampón de ruptura de los antígenos Gns-Gcs:** PBS 1X pH 7,4, PMSF 0,1 mM (Calbiochem, Inglaterra).
- **Tampón de ruptura del antígeno AndesVac:** Tampón Acetato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM pH 5,0 (Merck, Alemania), Tritón X-100 0.2%(v/v) (Merck, Alemania), NaCl 0,5 M (Merck Alemania), Glicerol 10%(v/v) (Merck, Alemania),  $\text{CaCl}_2$  5 mM (Merck, Alemania), PMSF 0,4 mM (Calbiochem, Inglaterra).

- **Tabla MM1: Tampones empleados para la solubilización del antígeno recombinante AndesVac.** Se muestran las condiciones probadas para solubilizar AndesVac insoluble. Tritón X-100 (Merck, Alemania), Tween-20 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), NaCl (Merck, Alemania), KCl (Merck, Alemania), Glicerol (Merck, Alemania), Urea (Merck, Alemania), DTT (Calbiochem, Inglaterra), CuSO<sub>4</sub> (Merck, Alemania), MgSO<sub>4</sub> (Merck, Alemania), CaCl<sub>2</sub> (Merck, Alemania), FeCl<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Glucosa (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Sacarosa (Merck, Alemania).

<b>Condiciones de solubilización</b>	
Tampón Acetato 50 mM pH 4,0	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 1 M
Tampón Acetato 50 mM pH 5,0	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 2 M
Tampón Fosfato 50 mM pH 6,0	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 3 M
Tampón Fosfato 50 mM pH 7,0	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 4 M
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 8,0	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 5 M
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 9,0	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 6 M
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Tritón X-100 0.2% (v/v)	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 7 M
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Tween-20 0.2% (v/v)	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Urea 8 M
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0.1 M	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, DTT 5 mM
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 0.5 M	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, CuSO <sub>4</sub> 10 mM
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 1.0 M	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, MgSO <sub>4</sub> 10 mM
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, KCl 0.1 M	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, CaCl <sub>2</sub> 10 mM
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, KCl 0.5 M	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, FeCl <sub>3</sub> 10 mM
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, KCl 1.0 M	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Glucosa 5% (p/v)
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Glicerol 10% (v/v)	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Sacarosa 5% (p/v)
Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4, Glicerol 30% (v/v)	Tampón Tris/HCl 50 mM pH 7,4



- **Solución de Solubilización de los antígenos Gns-Gcs:** Urea 8 M (Merck, Alemania),  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM (Sigma-Aldrich, EE.UU), PMSF 0,1 mM (Merck, Alemania), NaOH 20 mM (Merck, Alemania), pH $\approx$ 12.
- **Solución de Solubilización del antígeno AndesVac:** Tampón Acetato (CH<sub>3</sub>COOH/CH<sub>3</sub>COONa) 50 mM, pH 5,0 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Urea 5 M (Merck, Alemania), NaCl 0,5 M (Merck Alemania), CaCl<sub>2</sub> 10 mM (Merck, Alemania), Tritón X-100 0,2% (v/v) (Merck), Glicerol 30% (v/v) (Merck, Alemania).
- **Lisozima de clara de huevo** (Merck, Alemania).

#### 2.1.14. Purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)

- **Sistema de purificación de proteínas Äkta start** (GE Healthcare Life Science, Inglaterra).
- **Bomba P1** (GE Healthcare Life Science, Inglaterra).
- **Lector UV:** Econo UV Monitor (Bio-Rad, EE.UU.).
- **Columna:**
  - C16/20 (GE Healthcare Life Science, Inglaterra).
  - C10/20 (GE Healthcare Life Science, Inglaterra).
- **Matriz:** Chelating Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Science, Inglaterra).
- **Solución de carga:** Sulfato de níquel (NiSO<sub>4</sub>) 100 mM (Merck, Alemania).
- **Purificación del antígeno sGn obtenido por transducción adenoviral:**
  - **Buffer de Equilibrio sGn:** PBS 1X pH 7,4, NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), PMSF 0,5 mM (Merck, Alemania), Imidazol 10 mM (Merck, Alemania).
  - **Buffer de Lavado sGn:** PBS 1X pH 7,4, NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), PMSF 0,5 mM (Merck, Alemania), Imidazol 100 mM (Merck, Alemania).
  - **Buffer de Elución sGn:** PBS 1X pH 7,4, NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), PMSF 0,5 mM (Merck, Alemania), Imidazol 300 mM (Merck, Alemania).

- **Purificación del antígeno sGc obtenido por transducción adenoviral:**
  - **Buffer de Equilibrio sGc:** PBS 1X pH 7,4, NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), PMSF 0,5 mM (Merck, Alemania), Imidazol 10 mM (Merck, Alemania).
  - **Buffer de Lavado sGc:** PBS 1X pH 7,4, NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), PMSF 0,5 mM (Merck, Alemania), Imidazol 40 mM (Merck, Alemania).
  - **Buffer de Elución sGc:** PBS 1X pH 7,4, NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), PMSF 0,5 mM (Merck, Alemania), Imidazol 200 mM (Merck, Alemania).
- **Purificación de los antígenos Gns-Gcs:**
  - **Buffer de Equilibrio Gns-Gcs:** Urea 8M (Merck, Alemania),  $\beta$ -Mercaptoetanol 10mM (Sigma-Aldrich, EE.UU), Imidazol 5mM (Merck, Alemania), PMSF 0,1mM (Merck, Alemania), Tampón Fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50mM, pH 8,0 (Merck, Alemania).
  - **Buffer de Lavado Gns-Gcs:** Urea 8 M (Merck, Alemania),  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM (Sigma-Aldrich, EE.UU), Imidazol 100 mM (Merck, Alemania), PMSF 0,1 mM (Merck, Alemania), Tampón Fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM pH 8,0 (Merck, Alemania).
  - **Buffer de Elución Gns-Gcs:** Urea 8 M (Merck, Alemania),  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM (Sigma-Aldrich, EE.UU), Imidazol 200 mM (Merck, Alemania), PMSF 0,1 mM (Merck, Alemania), Tampón Fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM pH 8,0 (Merck, Alemania).
- **Purificación del antígeno AndesVac:**
  - **Solución de Equilibrio AndesVac:** Urea 5 M (Merck, Alemania), NaCl 0.5 M (Merck, Alemania),  $\text{CaCl}_2$  10 mM (Merck, Alemania), Tritón X-100 0,2% (v/v) (Merck, Alemania), Glicerol 30% (v/v) (Merck, Alemania), Imidazol 10 mM (Merck, Alemania), Tampón Acetato 50 mM, pH 6,0 (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
  - **Solución de Lavado AndesVac:** Tampón Acetato 50 mM, pH 5,0 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Urea 5 M (Merck, Alemania), NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), Glicerol 10%, Imidazol 30 mM (Merck, Alemania).
  - **Solución de Elución AndesVac:** Tampón Acetato 50 mM, pH 5,0 (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Urea 5 M (Merck, Alemania), NaCl 0,1 M (Merck, Alemania), Glicerol 10%, Imidazol 100 mM (Merck, Alemania).

### 2.1.15. Replegado y concentración de proteínas

- **Solución de replegado para los antígenos Gns-Gcs:** L-Arginina 0,8 M (Sigma-Aldrich, EE.UU.), NaCl 150 mM (Merck, Alemania), EDTA 1 mM (Merck, Alemania), Glutación Oxidado 750  $\mu$ M (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Tris 100 mM (Calbiochem, Inglaterra), PMSF 0,1 mM (Merck, Alemania).
- **Solución de inmunización para los antígenos Gns-Gcs:** NaCl 150 mM (Merck, Alemania), Tampón Fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 100 mM pH 8,0 (Merck, Alemania), PMSF 0,1mM (Merck, Alemania).
- **Solución de inmunización para el antígeno AndesVac:** NaCl 0,5 M (Merck, Alemania), L-Arginina 0,1 M (Sigma-Aldrich, EE.UU.), Glicerol 10% (p/v) (Merck, Alemania), Tampón Fosfato ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 50 mM pH 7,0 (Merck, Alemania).
- **Sistema de ultrafiltración Amicon Bioseparations Stirred Cells** (Merck, Alemania).
- **Discos de ultrafiltración de 5 KDa de Celulosa Regenerada** (Merck, Alemania).
- **Unidades Amicon® Ultra-4** de 10 kDa para filtración con centrifuga (Merck, Alemania).

### 2.1.16. Inmunización de animales

- **Controles vacunales:**
  - **C/AIF:** PBS formulado con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) 50% (v/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
  - **C/AIOH:** PBS formulado con Alhydrogel® 2% (AIOH) 50% (v/v) (Brenntag, Alemania).
- **Candidatos vacunales Gns-Gcs:**
  - **Gns-Gcs/AIF:** Gns-Gcs 0,4 g/L en Solución de Inmunización formulado con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) 50% (v/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
  - **Gns-Gcs/AIOH:** Gns-Gcs 0,4 g/L en Solución de Inmunización formulado con Alhydrogel® 2% (AIOH) 50% (v/v) (Brenntag, Alemania).

- **Candidatos vacunales AndesVac:**
  - **AndesVac/AIF:** AndesVac 0,4 g/L en Solución de inmunización formulado con Adyuvante Incompleto de Freund (AIF) 50% (v/v) (Sigma-Aldrich, EE.UU.).
  - **AndesVac/AIOH:** AndesVac 0,4 g/L en Solución de inmunización formulado con Alhydrogel® 2% (AIOH) 50% (v/v) (Brenntag, Alemania).

#### 2.1.17. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

- **Placas de 96 pocillos EIA/RIA** de fondo plano y alta unión a proteínas (Corning, EE.UU.).
- **Solución de recubrimiento:** Tampón Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ ) 50 mM, pH 9,4-9,6 (Merck, Alemania).
- **Solución de bloqueo:** Leche descremada 3% (p/v) (Svelty, Nestlé, Suiza) diluida en PBS.
- **Solución de dilución:** Leche descremada 1% (p/v) (Svelty, Nestlé, Suiza) diluida en PBS-Tween 20 0,05% (v/v) (Sigma-Aldrich, EEUU).
- **Tampón Sustrato:** Citrato trisódico di-hidratado ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) 0,1 M pH 4,5.
- **Solución de revelado:** o-Fenilendiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) 0,4 mg/mL en Tampón Sustrato, Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 30% (v/v) 0,4  $\mu\text{L}/\text{mL}$  (Merck, Alemania).
- **Solución de detención:**  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2,5 M (Merck, Alemania) .

#### 2.1.18. Inmunofluorescencia

- **Tampón fosfato salino (PBS; *Phosphate-Buffered Saline*):** 137 mM NaCl (Merck, Alemania), 2,7 mM KCl (Merck, Alemania), 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Merck, Alemania), 1,8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Merck, Alemania).
- **Paraformaldehído (PFA) 4%:** PFA (Merck, Alemania) diluido en PBS.
- **Solución de permeabilización:** Tritón X-100 (Merck, Alemania) 0,2% en PBS.
- **Solución de bloqueo:** Albúmina de suero bovino (BSA; *Bovine Serum Albumin*) (Sigma-Aldrich, EE.UU.) 1% en PBS.
- **Medio de Montaje Vectashield® con DAPI** (Laboratorios Vector, EE.UU.).

### 2.1.19. Kits comerciales

- **Gel Extraction Kit EZNA (Omega Bio-Tek, EE.UU.):** Utilizado para la purificación de ADN plasmidial desde geles de agarosa.
- **Qiagen Plasmid midi Kit (Qiagen, EE.UU.):** Kit utilizado para purificar plásmidos en calidad de transfección.
- **Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, EE.UU.):** Kit que combina la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$ , y la detección selectiva de  $\text{Cu}^{1+}$  por el ácido bicinconínico para la cuantificación de proteínas totales.
- **Pierce® ECL Western Blotting Substrate (ThermoScientific, EE.UU.):** Utilizado para la reacción quimioluminiscente detectada en los ensayos de *Western Blot*.
- **Pierce™ Biotin 3' End DNA Labeling Kit (ThermoFischer Scientific, EE.UU.):** Utilizado para el marcaje de las sondas a utilizar en los ensayos de *Dot Blot* de ADN
- **Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (ThermoFischer Scientific, EE.UU.):** Utilizado para la reacción quimioluminiscente detectada en los ensayos de *Dot Blot* de ADN.
- **AdEasy™ Adenoviral Vector System (Quantum Biotechnologies, EE.UU.):** Utilizado para la producción de Vectores Adenovirales.
- **ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen, EE.UU.):** Utilizado para la producción de Vectores Lentivirales.
- **Rneasy Micro Kit (Qiagen, EE.UU.):** Utilizado para la extracción y purificación de ARNm desde esplenocitos.
- **Power SYBR™ Green Cells-to-CT™ Kit (ThermoFischer Scientific, EE.UU.):** Utilizado para la evaluación de la respuesta inmune celular mediante qRT-PCR.

## **2.2. Métodos**

### **2.2.1. Métodos generales de manipulación de bacterias**

#### **2.2.1.1. Preparación de bacterias electrocompetentes**

A partir de placas de LB/estreptomicina fue tomada una colonia aislada de *E. coli* cepa Top10. La colonia fue inoculada en 5 mL de medio LB/estreptomicina e incubada a 37°C durante 12-16 horas en agitación orbital a 120 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente, 2 mL del precultivo fueron inoculados en un matraz con 500 mL de medio LB/estreptomicina, e incubado a 37°C con agitación. El cultivo fue crecido hasta una D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 y 0,8. El cultivo fue enfriado en hielo 30 minutos, y seguidamente centrifugado a 3.829 x g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado fue resuspendido en 460 mL de glicerol 10% frío. Este procedimiento se repitió, lavando las células con 400 mL de glicerol 10% frío, luego en 100 mL, después en 20 mL y finalmente las bacterias fueron resuspendidas en 1 mL de glicerol 10% frío. Por último, se hicieron alícuotas de 40 µL y se almacenaron a -80°C.

#### **2.2.1.2. Transformación de bacterias por electroporación**

Las bacterias electrocompetentes fueron incubadas con el plásmido o ligación (5-50 ng de ADN en un volumen no mayor a 5 µL) durante 5 minutos en hielo. La mezcla fue traspasada a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BioRad, EE.UU.). Fue aplicado un pulso de 2.5 kV mediante el equipo de electroporación (MicroPulser, BioRad, EE.UU.). Inmediatamente, las bacterias fueron recuperadas agregando 500 µL de medio LB, traspasadas a un microtubo (Eppendorf, Alemania) e incubadas entre 45-60 minutos a 37°C. Pasado este tiempo, una alícuota de 200 µL del cultivo fue sembrado en una placa de agar LB/antibiótico para seleccionar aquellas bacterias eficientemente transformadas. La placa fue incubada durante la noche a 37°C, y posteriormente almacenada a 4°C.

### **2.2.1.3. Preparación de bacterias quimiocompetentes**

A partir de placas de LB/estreptomicina fue tomada una colonia aislada de *E. coli* cepa Top10. La colonia fue inoculada en 5 mL de medio LB/estreptomicina e incubada a 37°C durante 12-16 horas en agitación orbital a 120 revoluciones por minuto (rpm). Posteriormente, 100 µL del precultivo fueron inoculados en un tubo con 5 mL de medio LB/estreptomicina, e incubado a 37°C con agitación. El cultivo fue crecido hasta una D.O.<sub>600</sub> entre 0,5 y 0,8. El cultivo fue enfriado en hielo 30 minutos, y seguidamente centrifugado a 6.000 rpm por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado fue resuspendido en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Este procedimiento se repitió, lavando las células 2 veces más de esta misma forma. Finalmente, las bacterias fueron resuspendidas en 500 µl de CaCl<sub>2</sub> 100 mM frío. Se hicieron alícuotas de 100 µL, las cuales fueron mantenidas en hielo para su uso inmediato.

### **2.2.1.4. Transformación de bacterias por choque térmico**

Para la transformación mediante shock térmico, fueron adicionados 5-50 ng de ADN a una alícuota de bacterias quimiocompetentes recién preparadas. La mezcla fue incubada en hielo durante 10 minutos. Seguidamente, se dio un golpe de calor a 42°C durante 2 minutos, y rápidamente la preparación fue incubada en hielo por 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 600 µL de medio LB y fue incubada a 37°C durante 45-60 minutos. Pasado este tiempo, una alícuota de 200 µL del cultivo fue sembrado en una placa de agar LB/antibiótico para seleccionar aquellas bacterias eficientemente transformadas. La placa fue incubada durante la noche a 37°C, y posteriormente almacenada a 4°C.

## **2.2.2. Métodos generales de análisis y manipulación de ADN**

### **2.2.2.1. Purificación de ADN plasmídico**

Las purificaciones de ADN plasmídico desde *E. coli* se realizaron mediante lisis alcalina (Birnboim & Doly, 1979). Para purificación del ADN, una colonia individual fue inoculada en un matraz conteniendo 300 mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección correspondiente, y fue incubada a 37°C con agitación orbital durante 16 horas. El cultivo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue desechado, y el precipitado fue resuspendido en 10 mL de Solución I de lisis alcalina. A la suspensión celular se le adicionaron 10 mL de Solución II de lisis alcalina, fue mezclada por inversión y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron 10 mL de Solución III de lisis alcalina y se mezcló por inversión. La mezcla fue incubada en hielo durante 20 minutos, y luego centrifugada a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. El sobrenadante fue eliminado, y al precipitado se adicionaron 0,8 volúmenes de isopropanol, y fue incubado a temperatura ambiente durante 10 minutos. Posteriormente, la muestra fue centrifugada a 12.000 rpm durante 30 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y el precipitado fue resuspendido en 600 µL de agua estéril. La resuspensión de ADN fue incubada a 37°C con 20 µg/mL de ARNasa durante 2 horas. Las proteínas contaminantes se extrajeron con fenol/cloroformo, y el precipitado final fue resuspendido en 300 µL de agua estéril. El ADN fue visualizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,8%.

En caso de que el ADN fuese requerido con un mayor grado de pureza, se realizó su purificación utilizando el kit Qiagen Plasmid midi Kit (Qiagen, EE.UU.), según las indicaciones del fabricante. La pureza del ADN purificado fue cuantificado mediante medición de su absorbancia a 260 nm, y su pureza mediante el ratio de absorbancia a 260/280 y 260/230 (espectrofotómetro SpectroStar Nano, BMG LabTech, Alemania).



### **2.2.2.2. Purificación de ADN genómico de levaduras**

Para purificación del ADN, una colonia individual fue inoculada en un tubo conteniendo 5 mL de medio YPD, e incubada a 37°C con agitación orbital durante 16 horas. El cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm durante 3 minutos. El sobrenadante fue desechado, y el precipitado resuspendido en 500 µL de Solución I. Se adicionaron 20 µL de Zimolasa (2,5 mg/mL) preparada en el momento, y la mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, fue centrifugada a 5.000 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 500 µL mL de Solución II suavemente con ayuda de micropipeta. Se adicionaron 50 µL de SDS 10% y se mezcló bien. La muestra fue incubada a 65°C durante 30 minutos. Posteriormente, se adicionaron 200 µL de acetato de potasio 5 M y se incubó en hielo durante 1 hora. La muestra fue centrifugada a 10.000 rpm durante 5 minutos. Cuidadosamente, el sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio. Se adicionó 1 volumen de isopropanol a temperatura ambiente, fue mezclado e incubado a temperatura ambiente durante 5 minutos. A continuación fue centrifugado a 6.000 rpm durante 1 minuto. Se desechó el sobrenadante y se incubó el microtubo abierto durante 10 minutos a temperatura ambiente, hasta evaporar todo el isopropanol. El ADN fue resuspendido en 50 µL de Solución III y a continuación fue tratado con 1 µL de RNasa (10 mg/mL) durante 30 minutos a 37°C.

### **2.2.2.3. Extracción con fenol/cloroformo**

Las muestras de ADN extraídas mediante lisis alcalina y tratadas con RNasa fueron purificadas mediante fenol/cloroformo. A las muestras se agregó 1 volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Fueron agitadas vigorosamente y centrifugadas a 12.000 rpm durante 5 minutos. La fase superior fue transferida a un microtubo limpio, y el tratamiento fue repetido hasta la desaparición de la fase intermedia. La fase superior fue colectada en un microtubo limpio, se adicionó 2.5 volúmenes de Etanol absoluto y 0.1 volúmenes del Acetato de sodio y fue incubada durante al menos 1 hora a -20 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, y el precipitado de ADN fue lavado con etanol al 70% para remover las sales. Las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 12.000 rpm, y finalmente el ADN precipitado fue resuspendido en el volumen deseado de agua estéril.

#### **2.2.2.4. Digestión de ADN con enzimas de restricción**

Para la digestión enzimática fue utilizado ADN plasmídico a una concentración final entre 50 y 100 µg/µL. Se emplearon enzimas de restricción a razón de 1 UI : 1 µg de ADN. Las reacciones fueron realizadas en el tampón correspondiente según las indicaciones del fabricante, incubando la reacción durante 2 horas a 37°C. La digestión se comprobó mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 0,8%.

#### **2.2.2.5. Reacciones de ligación de ADN plasmídico**

Las reacciones de ligación fueron realizadas empleando 100 ηg y distintas proporciones de la banda a insertar (relación banda:vector 1:1, 3:1, 6:1). La cantidad de banda en cada reacción se calculó según la guía de protocolos de New England Biolabs (1998):

$$\frac{\eta g \text{ de vector} \times \text{talla de banda (kb)} \times \text{proporción banda:vector}}{\text{talla del vector (kb)}} = \eta g \text{ de banda}$$

Todas las ligaciones fueron realizadas a temperatura ambiente durante toda la noche. De forma paralela se preparó una reacción de ligación carente de banda con y sin T4 ligasa. Todas estas muestras fueron transformadas utilizando la mitad del volumen de ligación en bacterias electrocompetentes.

#### **2.2.2.6. Dot Blot de ADN**

Para la identificación de levaduras transformadas con el plásmido pCBB-Gns, que hubiesen incorporado en su genoma el *cassette* para la expresión del antígeno Gns, se realizó la técnica de *Dot Blot* de ADN, una variación del protocolo de *Southern Blot* descrito por Southern (Southern, 2006). Se utilizó el ADN purificado desde clones de *Pichia pastoris* transformados con el plásmido pCBB-Gns, según el protocolo previamente descrito. A las muestras de ADN a analizar se añadió 20X SCC, hasta una concentración de 6X SCC. Posteriormente, fueron denaturadas en un baño de agua a 100°C durante 10 minutos. A continuación las muestras fueron puestas en hielo y se agregó 1 volumen de 20X SCC frío. Para realizar *dot blot* de ADN, se utilizó el sistema de microfiltración Bio-Dot® Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, EE.UU.). Para ello, se puso en el sistema una membrana de nitrocelulosa pre-incubada en 20X SSC durante 20 minutos, cuidando que no se formaran burbujas entre la membrana y el sistema de microfiltración, y sellando todos los espacios libres de membrana.

Mientras se aplicaba vacío al sistema, se depositaron 500  $\mu\text{L}$  de 20X SSC a los pocillos de muestra para re-hidratar la membrana. Se aplicaron 200  $\mu\text{L}$  de las muestras denaturadas a los pocillos y se permitió que la muestra se filtrara a través de la membrana de nitrocelulosa por vacío. La membrana fue removida del sistema de microfiltración y puesta sobre papel filtro empapado en solución de denaturación durante 10 minutos. A continuación, se transfirió la membrana sobre un papel filtro empapado en solución de neutralización durante 5 minutos. Finalmente, la membrana fue puesta sobre un papel filtro seco y se dejó secar. Una vez seca, el ADN fue fijado a la membrana exponiéndola a luz UV en transiluminador durante 30 minutos. La detección se realizó empleando una sonda correspondiente a la secuencia del antígeno Gns, utilizando los kits Pierce™ Biotin 3' End DNA Labeling Kit (ThermoFischer Scientific, EE.UU.) y Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module (ThermoFischer Scientific, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante.

### **2.2.3. Métodos generales de análisis y manipulación de levadura *Pichia pastoris***

#### **2.2.3.1. Preparación de levaduras electrocompetentes**

A partir de placas YPD fue tomada una colonia aislada de *P. Pastoris*. La colonia fue inoculada en 5 mL de medio YPD e incubada a 30°C durante toda la noche en agitación orbital. Posteriormente, este precultivo fue empleado para inocular 100 mL de medio YPD fresco. El cultivo fue crecido nuevamente a 30°C durante toda la noche en agitación orbital, hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de aproximadamente 1,4. El cultivo fue centrifugado a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado fue resuspendido en 20 mL de YPD/HEPES. Una vez resuspendidas las células, se añadió 500  $\mu\text{L}$  de DTT 1M y fue mezclado con suavidad. Las células fueron incubadas a 30°C durante 15 minutos. Posteriormente, se añadió 80 mL de Sorbitol 1M frío. Las células fueron centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C, descartando nuevamente el sobrenadante. El precipitado de células fue resuspendido con ayuda de vórtex en 100 mL de Sorbitol 1M frío. Las células fueron centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C, descartando nuevamente el sobrenadante. Las levaduras fueron resuspendidas en 4 mL de Sorbitol 1M frío. Nuevamente, las células fueron centrifugadas a 3.000 x g por 5 minutos a 4°C, descartando el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de Sorbitol 1M frío. Se hicieron alícuotas de 40  $\mu\text{L}$  que fueron mantenidas en hielo y usadas a la brevedad.

### **2.2.3.2. Transformación de levaduras por electroporación**

Se añadió 10 µg de ADN por alícuota de levaduras electrocompetentes y fue mezclado con suavidad. La mezcla fue transferida a una cubeta de electroporación de 0,2 cm (BioRad, EE.UU.) limpia y fría. El equipo de electroporación (MicroPulser, BioRad, EE.UU.) fue configurado con la opción "Pic", aplicando a la cubeta el pulso determinado para levaduras. Inmediatamente, las levaduras fueron recuperadas agregando 1 mL de Sorbitol 1M frío, en el caso de selección por auxotrofia, o 1 mL de YPD/Sorbitol frío en el caso de selección por resistencia a antibiótico. Fueron traspasadas a un microtubo (Eppendorf, Alemania) y sembradas inmediatamente en placas YNB en el caso de selección por auxotrofia, o incubadas durante 1-2 horas a 30°C en el caso de selección por resistencia a antibiótico y posteriormente sembrada en placas YPG con el antibiótico de selección. La placa fue incubada durante 72-96 horas a 30°C, y posteriormente almacenada a 4°C.

### **2.2.3.3. Inducción de levaduras para la expresión de proteínas recombinantes**

A partir de una placa de medio selectivo conteniendo colonias aisladas de la cepa de interés, fue tomada una colonia e inoculada en 5 mL de medio YPG. Fue incubada a 30°C con agitación durante 24-36 horas. Posteriormente, una alícuota de 4 mL de este cultivo fue llevado a un matraz con deflectores conteniendo 250 mL de medio YPG. El matraz fue incubado a 30°C con agitación durante 24 horas. Pasado este tiempo, el cultivo fue centrifugado a 6.000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado de levaduras fue resuspendido en 250 mL de medio YP suplementado con metanol 0,5% v/v. Después de 12 horas, fue añadido al cultivo metanol 0,75% v/v. Posteriormente, fue añadido metanol 1% v/v durante 48 horas. El cultivo fue centrifugado a 8.000 rpm durante 5 minutos, y se colectó el sobrenadante de cultivo y el precipitado de levaduras, almacenando la o las fracciones de interés a -20°C hasta su análisis posterior.

### **2.2.3.4. Ruptura de levaduras para análisis de fracciones intracelulares**

Fue realizada la ruptura celular del precipitado de levaduras inducidas según lo descrito anteriormente. Para ello, alícuotas 25 µL de los precipitado fueron puestos en microtubos limpios. Fueron añadidos 500 µL de la Solución I de purificación de ADN genómico de levadura y el precipitado fue resuspendido empleando vórtex.

Fueron agregados 20  $\mu\text{L}$  de Zimolasa (2,5 mg/mL). La mezcla fue incubada a 37°C durante 1 hora. Posteriormente, los microtubos fueron centrifugados a 5.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante, correspondiente a la fracción periplásmica, fue traspasado a microtubos limpios. El precipitado fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de PBS-Tween 20 2%. Los tubos fueron centrifugados a 10.000 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante, correspondiente a la fracción intracelular soluble, fue traspasado a microtubos limpios. El precipitado, correspondiente a la fracción intracelular insoluble, fue resuspendido en 100  $\mu\text{L}$  de PBS. Las distintas fracciones intracelulares fueron posteriormente analizadas mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*.

## **2.2.4. Métodos generales de análisis y manipulación de proteínas**

### **2.2.4.1. Precipitación de muestras de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)**

Se añadieron 0,1 volúmenes de desoxicolato de sodio 0.15% (p/v) a la muestra de proteínas a precipitar. La muestra fue agitada en vórtex durante 30 segundos, e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Se añadió 0,1 volúmenes de ácido tricloroacético 76% (v/v) a la muestra, fue agitada en vórtex durante 30 segundos, e incubada a temperatura ambiente por 10 minutos. Luego la muestra fue centrifugada a 8.000 x g durante 20 minutos. El sobrenadante fue descartado, y el precipitado fue lavado con 1 volumen de acetona fría. La muestra fue nuevamente centrifugada a 8.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue nuevamente descartado, y el precipitado fue dejado a temperatura ambiente hasta la evaporación total de la acetona. Finalmente, la muestra fue resuspendida en un volumen adecuado de agua destilada esterilizada. La muestra resultante fue analizada mediante electroforesis en gel poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (*SDS-PAGE: Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) o almacenada a -20°C hasta su utilización.

#### 2.2.4.2. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) unidimensional

Se prepararon geles denaturantes de poliacrilamida de 0,1 mm de grosor a la concentración requerida. Los geles separador y concentrador se prepararon de acuerdo a la siguiente tabla:

**Tabla MM2: Protocolo de preparación de geles denaturantes de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico**

	<b>Gel Separador 10 %</b>	<b>Gel Separador 12 %</b>	<b>Gel Concentrador</b>
<b>Agua destilada</b>	4,70 mL	4,00 mL	2,60 mL
<b>Acrilamida 30%-Bisacrilamida 0.8%</b>	4,00 mL	4,80 mL	1,00 mL
<b>Tris-HCl 1.5 M pH: 8.0</b>	3,00 mL	3,00 mL	-
<b>Tris-HCl 0.5 M pH: 6.5</b>	-	-	1.25 mL
<b>SDS 10%</b>	120 µL	120 µL	50 µL
<b>PSA 10%</b>	120 µL	120 µL	50 µL
<b>TEMED</b>	12 µL	12 µL	5 µL

Para la electroforesis unidimensional de proteínas fue utilizado el sistema de electroforesis en gel Mini-PROTEAN® Tetra System (Bio-Rad, EE.UU.). A las muestras de proteínas se les añadió tampón de carga reductor o no reductor según el análisis a realizar. Las muestras de proteínas a analizar en condiciones reductoras fueron posteriormente incubadas a 98°C durante 10 minutos en una placa térmica. Las muestras fueron cargadas en los pocillos del gel, y se emplearon 3 µL de RGB Plus Prestained Protein ladder (Maestrogen) de patrón de peso molecular. La electroforesis fue realizada en tampón de corrida, empleando una corriente constante de 25 mA por gel. Posteriormente el gel fue teñido con Azul de Coomassie durante 30-60 minutos en agitación, y luego fue desteñido hasta la aparición de bandas de proteínas.

### **2.2.4.3. Western Blot**

Una vez finalizada la electroforesis, se realizó la transferencia de proteínas a una membrana de nitrocelulosa para su posterior inmunodetección. La transferencia fue realizada en una celda de transferencia semi-seca (TransBlot® SD Semi-Dry Transfer Cell, BioRad, EE.UU.), a una corriente constante correspondiente a 5,5 mA/cm<sup>2</sup> de superficie de transferencia, durante 30 minutos, a un voltaje máximo de 25 V. Una vez terminada la transferencia, los sitios inespecíficos de la membrana fueron bloqueados con solución de bloqueo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente con agitación. El ensayo de *Western Blot* se realizó incubando la membrana con el anticuerpo monoclonal indicado a una concentración óptima durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, la membrana fue lavada con solución de lavado 3 veces durante 10 minutos cada vez y en agitación. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario adecuado, a la concentración óptima, durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue lavada por 10 minutos con solución de lavado. En aquellos casos que el anticuerpo secundario estuviera conjugado a una sonda fluorescente, la membrana fue revelada utilizando el equipo detector de fluorescencia Odyssey® CLx (Li-Cor Biosciences, EE.UU.). Para aquellos anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP: *Horseradish Peroxidase*), la reacción de revelado fue efectuada en el casete de revelado (Kodak, Chile) utilizando el kit "Pierce® ECL Western Blotting Substrate" (ThermoScientific, EE.UU.). El film fue expuesto bajo luz infrarroja a la reacción quimioluminiscente. Luego, fue revelado por 2 minutos con la solución Carestream® Kodak® processing chemicals for autoradiography films (Sigma, EE.UU.), lavado, y fijado por 2 minutos con la solución "Fixer and replenisher" (Kodak), nuevamente lavado y secado a temperatura ambiente.

#### **2.2.4.4. Dot blot de proteínas**

Para realizar *dot blot* de muestras proteicas se utilizó el sistema de microfiltración Bio-Dot® Microfiltration Apparatus (Bio-Rad, EE.UU.). Para ello, se puso en el sistema una membrana de nitrocelulosa pre-incubada en TBS durante 10 minutos, cuidando que no se formaran burbujas entre la membrana y el sistema de microfiltración, y sellando todos los espacios libres de membrana. Mientras se aplicaba vacío al sistema, se depositaron 100 µL de TBS a los pocillos de muestra para re-hidratar la membrana. Se aplicaron 200 µL de muestra a los pocillos y se permitió que la muestra se filtrara a través de la membrana de nitrocelulosa por gravedad. Posteriormente, la membrana fue lavada dos veces con 200 µL de TBS en cada pocillo. La membrana fue removida del sistema de microfiltración, y bloqueada con solución de bloqueo durante al menos 2 horas a temperatura ambiente con agitación. Hecho esto, la membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal indicado a una concentración óptima durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, la membrana fue lavada con solución de lavado 3 veces durante 10 minutos cada vez y en agitación. Luego, la membrana fue incubada con el anticuerpo secundario adecuado, a la concentración óptima, durante 1 hora a temperatura ambiente. La membrana fue lavada por 10 minutos con solución de lavado. Finalmente, la membrana fue revelada utilizando el equipo detector de fluorescencia Odyssey® CLx (Li-Cor Biosciences, EE.UU.).

#### **2.2.4.5. Cuantificación de proteínas totales**

Para cuantificar las proteínas totales fue utilizado el kit Pierce BCA Protein Assay (Thermo Scientific, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante. Se construyó una curva de albúmina de suero bovino (BSA: *Bovine Serum Albumin*) con concentraciones de 1.000, 750, 500, 250, 125, y 0 µg/mL. La absorbancia fue medida a 562 nm en espectrofotómetro SpectroStar Nano (BMG LabTech, Alemania). La concentración de las muestras fue determinada a través del software de análisis de datos MARS Data Analysis Software (BMG LabTech, Alemania). Cuando no fuese posible realizar el procedimiento anteriormente descrito, y según fuese necesario, se estimó la concentración de proteínas mediante densitometría óptica. Para ello, fue realizada una curva densitométrica de BSA de 0,1 a 5 µg de proteína la cual fue sometida a *SDS-PAGE* junto a la muestra de interés. Posteriormente, la concentración de la muestra fue estimada mediante densitometría óptica empleando el software ImageJ (Schneider et al., 2012) a partir de la imagen digital del gel teñido con Azul de Coomasie.



## **2.2.5. Técnicas generales de cultivo celular**

### **2.2.5.1. Descongelación**

El ámpula conteniendo las células de interés fue descongelado rápidamente en un baño termostatizado a 37°C con agitación. El contenido fue traspasado a un tubo de 15 mL y fueron adicionados 10 volúmenes de medio DMEM. El tubo fue centrifugado a 1.000 x g durante 5 minutos en centrífuga de ángulo libre (Hettich, Alemania). El sobrenadante fue descartado, y las células fueron resuspendidas en medio de crecimiento. Éstas fueron sembradas en una placa de cultivo de 100 mm de diámetro (Santa Cruz Biotechnology, EE.UU.) e incubadas a 37°C, en presencia de CO<sub>2</sub> al 5% y con una humedad relativa (HR) del 95%.

### **2.2.5.2. Propagación**

A partir de un cultivo a un 95% de confluencia celular, el medio fue eliminado mediante aspiración y las células fueron lavadas una vez con PBS. Posteriormente, fue adicionada solución de tripsina y la placa fue incubada a 37°C entre 1 y 5 minutos. Al cabo de este tiempo, las células fueron resuspendidas suavemente en medio de crecimiento, traspasadas a un tubo de 15 mL y centrifugadas a 1.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue aspirado y las células fueron resuspendidas en 2 mL de medio de crecimiento. Las células fueron contadas en cámara de Neubauer determinando la cantidad a sembrar. Las células fueron sembradas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro e incubadas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y HR al 95%.

### **2.2.5.3. Congelación**

A partir de un cultivo celular en fase de crecimiento exponencial, el medio fue eliminado mediante aspiración y las células fueron lavadas una vez con PBS. Posteriormente, fue adicionada solución de tripsina y la placa fue incubada a 37°C entre 1 y 5 minutos. Al cabo de este tiempo, las células fueron resuspendidas suavemente en medio de crecimiento, traspasadas a un tubo de 15 mL y centrifugadas a 1.000 x g durante 5 minutos. El sobrenadante fue aspirado y las células fueron resuspendidas en medio de congelación, previamente enfriado en hielo, de forma tal que quedasen a una concentración final de 3x10<sup>6</sup> células/mL. La suspensión celular fue depositada en criotubos (Nalgene, EE.UU.), los cuales fueron incubados a -80°C durante 24 hrs y luego almacenados en tanques de nitrógeno líquido.

#### **2.2.5.4. Transfección con polietilenimina (PEI)**

Las transfecciones fueron realizadas según lo descrito por Toledo y cols. (Toledo et al., 2009). Las células fueron transfectadas empleando el ADN de interés en una relación PEI ( $\mu\text{l}$ ) : ADN ( $\mu\text{g}$ ) de 2,5 : 1. Brevemente, tanto el ADN como el PEI fueron puestos en microtubos separados y les fue adicionada glucosa al 5% hasta completar 100  $\mu\text{L}$ . Ambos tubos fueron agitados vigorosamente y dejados reposar durante 10 minutos. Durante este tiempo las células fueron lavadas 2 veces con PBS. Posteriormente, fue añadida la mezcla de PEI a la mezcla de ADN, e inmediatamente mezclados vigorosamente en vortex durante 1 minuto. La mezcla de PEI y ADN fue dejada reposar a temperatura ambiente durante 10 minutos. Pasado este tiempo, fueron adicionados 9 mL de DMEM y la mezcla fue añadida suavemente sobre la capa de células. Las células fueron incubadas a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% y HR al 95% 8 horas antes de adicionarle 1 mL de SFB.

#### **2.2.5.5. Obtención de extracto citoplasmático**

Para la obtención del extracto citoplasmático, las células de interés fueron lavadas con PBS 1X frío. El líquido fue aspirado, y fue agregado sobre la monocapa celular 1 mL de Solución RIPA por placa de 100 mm. Las células fueron extraídas usando un raspador de células y depositadas en un microtubo de 1,5 mL. El tubo con las células fue incubado en hielo por 30 minutos, agitando con vortex durante 1 minuto cada 10 minutos. Posteriormente, el microtubo conteniendo las células fue centrifugado a 14.000 x g por 15 minutos. El sobrenadante, correspondiente al extracto citoplasmático, fue llevado a un microtubo limpio y almacenado a -80°C hasta su posterior utilización.

#### **2.2.5.6. Microscopía**

Para observar la expresión de eGFP utilizado como marcador de transfección o transducción, fue utilizado el microscopio FLoid® Cell Imaging Station (Life Technologies). Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo 20X y una magnificación total de 460X. Para la obtención de fluorescencia fue usado el canal verde que excita a 482 nm y emite a 532 nm.

Para la obtención de las imágenes de inmunofluorescencia fue utilizado el Microscopio de Fluorescencia Olympus IX8. Las imágenes fueron obtenidas con un objetivo de 60X. Para la obtención de fluorescencia fue usado un filtro que excita entre 470-495 nm y emite entre 510-550 nm.

## **2.2.6. Diseño, expresión y purificación de los antígenos recombinantes basados en la proteínas de Virus Andes**

### **2.2.6.1. Obtención de los antígenos recombinantes sGn y sGc expresados en células de mamíferos**

#### **2.2.6.1.1. Diseño de los antígenos basados en las regiones expuestas de las glicoproteínas sGn y sGc de Virus Andes**

Para el diseño de los antígenos recombinantes basados en las glicoproteínas Gn y Gc de Virus Andes, se analizó la secuencia aminoacídica del precursor de las glicoproteínas GPC (NCBI: NP\_604472.1). Se emplearon distintos programas bioinformáticos de DTU Bioinformatics (Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark) para predecir el sitio proteolítico del precursor (ProP 1.0) (Duckert et al., 2004), las regiones transmembranas (TMHMM 2.0) (Sonnhammer et al., 1998), el péptido señal (SignalP 4.0) (Petersen et al., 2011) y los sitios potenciales de N-glicosilación (NetNGlyc 1.0) (Gupta & Brunak, 2002). También se evaluaron secuencias consenso para la retención en compartimientos celulares utilizando la versión en línea del programa PSORTII (Nakai & Horton, 1999) de la Universidad de Tokyo. Una vez identificados los ectodominios de Gn y Gc, a cada una de las secuencias se le adicionó en el extremo N-terminal el péptido señal de la Eritropoyetina (UniProtKB ID: P01588), consistente en los primeros 27 aminoácidos de dicha secuencia, y hacia el extremo C-terminal un péptido espaciador compuesto por 3 repeticiones de SGGGG seguido de una cola de 7 histidinas. Cada uno de estos antígenos recombinantes diseñados fueron denominados sGn y sGc, respectivamente. Los genes diseñados para sGn y sGc, fueron obtenidos mediante síntesis química por la empresa Blue Heron (EE.UU.) y clonados en el vector pCMV6-Entry (Origene), para generar los vectores de expresión en mamíferos pEntry-sGn y pEntry-sGc.

### **2.2.6.1.2. Generación de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos**

#### **2.2.6.1.2.1. Generación de plásmidos para la obtención de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos**

Los vectores adenovirales fueron construidos utilizando el AdEasy™ Adenoviral Vector System (Quantum Biotechnologies, EE.UU.) (He et al., 1998; Luo et al., 2007). Para ello, las secuencias codificantes para sGn y sGc, insertas en el vector pEntry-sGn y pEntry-sGc, respectivamente, fueron extraídas a través de la digestión con las endonucleasas de restricción *EcoR* V y *Bgl* II (NewEnglandBiolabs, EE.UU.). El vector pAdTrack-CMV fue digerido con las mismas enzimas y posteriormente tratado con fosfatasa antártica durante 1 hora a 37°C. Tanto las bandas codificantes para las variantes de Gn y Gc como el vector pAdTrack-CMV obtenidos luego de la digestión, fueron corridos en geles de agarosa y extraídos desde este utilizando “Gel Extraction Kit” (Omega Bio-Tek, EE.UU.). Luego, se realizó la ligación de los fragmentos de interés y de los controles adecuados. Los productos de estas ligaciones fueron electroporados en bacterias Top10, las cuales posteriormente fueron sembradas en placas LB/Kanamicina e incubadas a 37°C por aproximadamente 20 horas. Las colonias crecidas en el medio selectivo fueron analizadas mediante extracción de ADN y análisis de restricción con las endonucleasas *Nco* I y *Sma* I (NewEnglandBiolabs, EE.UU.). Los vectores de transferencia recombinantes obtenidos fueron denominados pAdTrack-sGn y pAdTrack-sGc.

#### **2.2.6.1.2.2. Obtención de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos**

Cada vector de transferencia recombinante con la secuencia codificante para sGn y sGc se linealizó con la endonucleasa *Pme* I (NewEnglandBiolabs, EE.UU.). Se empleó 1 µg de cada producto linealizado y se co-electroporó con 200 ng del plásmido pAdEasy-1 (Quantum Biotechnologies, EE.UU) en la cepa de *E. coli* BJ5183. Como controles, también se electroporaron por separado con 200 ng de pAdEasy-1, 1 µg de pAdTrack-sGn I y 1 µg de pAdTrack-sGc, todos ellos linealizados con *Pme* I.

Las bacterias posteriormente fueron sembradas en placas LB/Kanamicina. Mediante el proceso de recombinación homóloga de los elementos co-electroporados, se obtuvo como resultado la inserción de los genes de interés en el genoma adenoviral. Se extrajo ADN de los clones crecidos en el medio selectivo, y los genomas recombinantes fueron identificados y confirmados por análisis de restricción con la endonucleasa *Pac* I (NewEnglandBiolabs, EE.UU.). El ADN de interés se empleó para la transformación de bacterias *E.coli* TOP10 para su amplificación. Las bacterias fueron crecidas y luego el ADN fue purificado utilizando el kit Qiagen Plasmid Midi (Qiagen, EE.UU).

El genoma adenoviral recombinante fue liberado del genoma bacteriano presente en los plásmidos obtenidos mediante la digestión con la endonucleasa *Pac* I. Posteriormente fue transfectado en la línea celular de complementación para la generación de los vectores adenovirales HEK-293 a un 80% de confluencia en en placas de 100 mm utilizando PEI (Toledo et al., 2009). La eficiencia de transfección se evaluó cualitativamente por observación de color verde en células transfectadas expuestas a la luz ultravioleta en el microscopio. El cultivo de cada transfección se mantuvo en monocapa celular durante 15 días, quitando la mitad de medio y agregando la misma cantidad de DMEN al 5% de SFB, hasta la observación de halos de lisis, resultantes de la infección de viriones formados a células vecinas. Producto de sucesivas transfecciones, se obtuvo los vectores adenovirales codificantes para cada uno de los antígenos recombinantes sGn y sGc, denominados Ad-sGn y Ad-sGc, respectivamente.

#### **2.2.6.1.2.3. Amplificación de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos**

Para la amplificación de los vectores Ad-sGn y Ad-sGc, se colectó los medios de cultivo y células de las transfecciones con halos de lisis, y se centrifugó a 800 rpm durante 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 5 mL de DMEM y congeladas a -20°C. Luego fueron descongeladas a 37 °C y se les dio vórtex por un minuto. Este proceso de congelación-descongelación se efectuó tres veces consecutivas. Se centrifugó a 2.000 rpm por 5 minutos, colectando el sobrenadante con los viriones.

Este sobrenadante fue utilizado para infectar cultivos de células HEK293, que 72 horas después fueron sometidos al mismo procedimiento. Se efectuaron rondas sucesivas de amplificación hasta alcanzar el título viral requerido para cada adenovirus.

#### **2.2.6.1.2.4. Titulación de vectores adenovirales para la expresión de los antígenos sGn y sGc en células de mamíferos**

La titulación de los distintos pases adenovirales se efectuó en placas de 96 pocillos con células HEK293 a 60-80% de confluencia. A partir de una dilución inicial de la muestra de 1 en 40 se efectuaron 11 diluciones sucesivas en base 5. Empleando 40 µL de cada una de estas 12 diluciones se infectó las células de cada pocillo. Las células infectadas se incubaron 72 horas y pasado este tiempo se contó en microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón) el número de células verdes en la última dilución en la que estas eran visibles. Se definió como una partícula viral o unidad formadora de color (UFC) a cada célula fluorescente en la última dilución donde se visualizaba al menos una de estas. Se consideró tanto el número de células como las diluciones y el volumen inicial para expresar el título viral en UFC/mL. Cada titulación se efectuó por triplicado y el título obtenido corresponde al promedio de las determinaciones. Se utilizó como control negativo células no infectadas.

### **2.2.6.1.3. Expresión de los antígenos sGn y sGc en células SiHa transducidas con los vectores adenovirales Ad-sGn y Ad-sGc**

A fin de evaluar la funcionalidad de los vectores adenovirales amplificados, células SiHa fueron infectadas con Ad-sGn, Ad-sGc o con ambos vectores adenovirales a una multiplicidad de infección (*Multiplicity Of Infection*, MOI) de 70. A las 24 horas se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS dos veces, y finalmente fueron dejadas en medio DMEM e incubadas a 37°C. Posterior a 72 horas, se colectó por separado el medio extracelular y las células de los cultivos, de las que se obtuvo su extracto citoplasmático. Se evaluó la presencia de sGn y sGc en el medio extracelular y en el extracto citoplasmático de cada grupo experimental, mediante *SDS-PAGE* 10% y *Western Blot*. Para los ensayos de *Western Blot*, se utilizó como anticuerpos primarios anticuerpo anti-Gn ANDV (Austral Biologicals, EE.UU.) o anticuerpo anti-Gc ANDV (Austral Biologicals, EE.UU.) en una dilución 1:10.000.

#### **2.2.6.1.3.1. Determinación de la multiplicidad de infección óptima para la expresión de los antígenos sGn y sGc**

La determinación de la multiplicidad de infección óptima para la generación de cada proteína recombinante se efectuó en cultivos de células SiHa al 100% de confluencia en placas de 6 pocillos. Cada pocillo fue infectado con 0, 5, 25, 50, 100 o 150 partículas virales por célula. A las 24 horas se retiró el medio de cultivo, y luego de 2 lavados con PBS, las células se dejaron con medio DMEM sin suero. Se tomaron imágenes de las células a las 48 horas post-transducción. A las 72 horas se colectó por separado el medio extracelular y las células de cada cultivo, de las cuales se obtuvo el extracto citoplasmático. Se realizó la precipitación de las proteínas presentes en cada fracción, y se analizaron mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*, empleando anticuerpos específicos anti-Gn ANDV y anti-Gc ANDV (Austral Biologicals, EE.UU.).

#### **2.2.6.1.4. Purificación de los antígenos sGn y sGc**

Para la purificación de los antígeno sGn y sGc se emplearon 5 mL de matriz Chelating Sepharose Fast Flow en una columna de cromatografía C10/20. La columna fue conectada a una bomba P1 y a continuación se conectó un lector UV Econo UV Monitor (Bio-Rad). La matriz fue cargada con iones níquel pasando 2 volúmenes (10 mL) de NiSO<sub>4</sub> 100 mM a un flujo de 1 mL/min. A continuación, fue lavada con 20 mL de agua miliQ. La matriz fue equilibrada con 8 volúmenes (40 mL) de tampón de equilibrio sGn/sGc. Se cargó en la matriz con la muestra conteniendo el antígeno a purificar, correspondiente a 5 mL de extracto citoplasmático de células SiHa transducidas con el vector adenoviral Ad-sGn o 100 mL de sobrenadante de cultivo de células SiHa transducidas con el vector adenoviral Ad-sGc.

Fueron colectadas las proteínas no adheridas a la matriz. Una vez pasada la muestra, la matriz fue lavada con Tampón de equilibrio, hasta observar una disminución de la absorbancia hasta un nivel basal.

Para determinar las condiciones óptimas de purificación, fue realizado un gradiente de imidazol de 0 a 500 mM a una velocidad de 1 mL/min. Así, fueron determinadas las concentraciones de imidazol óptimas para lavado de las proteínas contaminantes y elución de cada uno de los antígenos sGn y sGc. En base a estos parámetros, la matriz fue lavada con Tampón de Lavado y se colectó la muestra resultante.

Por último, se eluyó con Tampón de Elución, a un flujo de 0,5 mL/min. Todas las muestras colectadas fueron posteriormente analizadas mediante *SDS-PAGE* teñido con Azul de Coomassie y *Western Blot*. Finalmente, fue realizada la cuantificación de los antígeno recombinante, así como determinado su nivel de pureza mediante densitometría empleando el software ImageJ (Schneider et al., 2012).



## **2.2.6.2. Obtención de los antígenos recombinantes Gns y Gcs expresados en *Pichia pastoris***

### **2.2.6.2.1. Diseño de los antígenos basados en las regiones expuestas de las glicoproteínas Gns y Gcs de Virus Andes**

Para el diseño de los antígenos recombinantes basados en las glicoproteínas Gn y Gc de Virus Andes, se analizó la secuencia aminoacídica del precursor de las glicoproteínas GPC (NCBI: NP\_604472.1) . Se emplearon distintos programas bioinformáticos de DTU Bioinformatics (Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark) para predecir el sitio proteolítico del precursor (ProP 1.0) (Duckert et al., 2004), las regiones transmembranas (TMHMM 2.0) (Sonnhammer et al., 1998), el péptido señal (SignalP 4.0) (Petersen et al., 2011) y los sitios potenciales de N-glicosilación (NetNGlyc 1.0) (Gupta & Brunak, 2002). Se identificaron las regiones expuestas tanto de la glicoproteína Gn como de Gc, y se mantuvieron intactas estas secuencias. A cada una de ellas se le añadió la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* en el extremo N-terminal y un tag de 7 residuos de histidina en el extremo C-terminal para facilitar su purificación e identificación. A partir de estas secuencias aminoacídicas, se diseñó la secuencia nucleotídica de los antígenos denominados Gn y Gc. Para ello se tuvo en consideración el uso de codones optimizado para la expresión de las moléculas recombinantes en la levadura metilotrófica *P. pastoris*. Los genes fueron sintetizados por la compañía GenScript (República Popular China) dentro del vector pCBBhis3 en el caso de Gns y dentro del vector pCBBz en el caso de Gcs. Los plásmidos fueron denominados pCBB-Gns y pCBBz-Gcs respectivamente.

### **2.2.6.2.2. Generación de clon de levadura para la expresión del antígeno Gns**

Se transformaron levaduras *Pichia pastoris* cepa MP36 con el plásmido pCBB-Gns según la metodología descrita anteriormente. Se realizó la selección de recombinantes por auxotrofia, mediante crecimiento en medio mínimo (Agar YNB). Los clones obtenidos fueron chequeados mediante *Dot Blot* de ADN, empleando como sonda el fragmento de ADN codificante para el gen del antígeno Gns. Se comprobó posteriormente la capacidad de estos clones de producir el antígeno de interés mediante inducciones a pequeña escala.

#### **2.2.6.2.3. Generación de clon de levadura para la co-expresión del antígeno Gcs**

Se transformaron levaduras *Pichia pastoris* cepa C4-G1, que expresa al medio de cultivo el antígeno Gns, con el plásmido pCBBz-Gcs según la metodología descrita anteriormente. Se realizó la selección de recombinantes mediante crecimiento en agar conteniendo zeocina como agente selectivo. Se comprobó posteriormente la capacidad de estos clones de producir tanto el antígeno Gns como el antígeno Gcs mediante inducciones a pequeña escala.

#### **2.2.6.2.4. Expresión de los antígenos recombinantes Gns y Gcs mediante fermentación de *Pichia pastoris* doblemente transformada**

El clon C11-Gn/Gc se utilizó para escalar la producción de los antígenos Gns y Gcs en fermentador de 10L con condiciones controladas de temperatura, agitación, aireación y pH. La fermentación se realizó en dos pasos; se utilizó glicerol como fuente de carbono en la etapa inicial del cultivo y posteriormente se empleó metanol, una vez que el glicerol se consumió totalmente (después de las primeras 20 h post-inoculación). De esta forma, el metanol se mantuvo durante el resto de la fermentación como fuente de carbono. Con la adición de metanol se produjo la inducción de los promotores del gen AOX1, y por tanto la producción de las proteínas Gns y Gsc. La fase de inducción duró 96 horas, con un incremento de biomasa (peso húmedo) desde aproximadamente 45 g/L hasta 300 g/L.

La biomasa fue separada del sobrenadante de cultivo mediante centrifugación a 8.000 rpm durante 10 minutos. Se analizó la presencia de los antígenos en una muestra de levaduras mediante ruptura enzimática y posterior análisis mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*. La biomasa fue almacenada a -80°C hasta su uso.

#### **2.2.6.2.5. Ruptura de las levaduras fermentadas para la expresión de los antígenos Gns y Gcs**

Se empleó la biomasa proveniente de la fermentación de C11-Gn/Gc previamente obtenida. Las células fueron primero rotas en Tapón de Ruptura Gns-Gcs. Para ello, se emplearon dos métodos: homogeneizador por presión o molino de perlas.

Para la ruptura en homogeneizador por presión, el precipitado de células obtenido desde la fermentación fue resuspendido en Tampón de ruptura Gns-Gcs a una concentración de 2,5 g/100 mL. Se realizaron 10 ciclos de homogeneización, manteniendo la muestra en hielo durante todo el proceso.

Se centrifugó la muestra resultante a 5.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Se colectaron las fracciones solubles e insolubles de ruptura, las cuales fueron analizadas mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*. La fracción insoluble de ruptura fue almacenada a -20°C hasta el momento de su uso.

Para la ruptura en molino de perlas, el precipitado de células obtenido desde la fermentación fue resuspendido en Tampón de ruptura Gns-Gcs a una concentración de 10 g/100 mL. Se realizaron 10 ciclos de ruptura. Se colectó la biomasa rota y fue centrifugada. Se centrifugó a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se colectaron las fracciones solubles e insolubles de ruptura, las cuales fueron analizadas mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*. La fracción insoluble de ruptura fue almacenada a -20°C hasta el momento de su uso.

#### **2.2.6.2.6. Solubilización de los antígenos Gns y Gcs**

Se probaron distintas condiciones para lograr la solubilización de los antígenos recombinantes Gns y Gcs desde la fracción insoluble de ruptura. Para ello, se modificaron condiciones como el empleo de distintas concentraciones de agente caotrópico (Urea desde 0 hasta 8 M), uso de agentes reductores ( $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM) y distintos tampones en un amplio rango de pH (desde 4 hasta 12). Finalmente, se estableció la solubilización de los antígenos en Tampón de Solubilización Gns-Gcs, conteniendo Urea 8M,  $\beta$ -Mercaptoetanol 10 mM, NaOH 20 mM, pH 12. La fracción insoluble de ruptura se resuspendió en Tampón de Solubilización Gns-Gcs a una concentración de 2,5 g/100 mL. La muestra fue incubada durante 1 hora a 45°C, dando vórtex intensamente durante 1 minuto cada 15 minutos. Se centrifugó la muestra solubilizada a 10.000 rpm por 15 minutos a 4°C. Se colectaron las fracciones solubles e insolubles de solubilización, las cuales fueron analizadas mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*. Se ajustó pH a la fracción soluble de solubilización utilizando  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1M y HCl, hasta una concentración de Fosfato 50mM y pH 8,0. Se guardó la fracción soluble a -20°C hasta su uso.

#### **2.2.6.2.7. Purificación de Gns y Gcs mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)**

Para la purificación de los antígenos Gns y Gcs se emplearon 10 mL de matriz Chelating Sepharose Fast Flow en una columna de cromatografía C16/20. La columna fue instalada en el equipo de purificación ÄKTASTART. La matriz fue cargada con iones níquel pasando 2 volúmenes (10 mL) de  $\text{NiSO}_4$  200 mM a un flujo de 1 mL/min.

A continuación, fue lavada con 100 mL de agua miliQ. La matriz fue equilibrada con 8 volúmenes (80 mL) de Tampón de Equilibrio Gns-Gcs. Se cargó en la matriz la fracción solubilizada, conteniendo a ambos antígenos Gns y Gcs, a un flujo de 0,5 mL/minuto. Fueron colectadas las proteínas no adheridas a la matriz. Una vez pasada la muestra, la matriz fue lavada con Tampón de Equilibrio Gns-Gcs hasta observar una disminución de la absorbancia hasta un nivel basal.

Para determinar las condiciones óptimas de purificación, fue realizado un gradiente escalonado de imidazol de 0 a 500 mM, con variaciones de 50 mM. Así, fueron determinadas las concentraciones de imidazol óptimas para lavado de las proteínas contaminantes y elución de ambos antígenos. En base a estos parámetros, la matriz fue lavada con Tampón de Lavado Gns-Gcs a un flujo de 1 mL/min y se colectó la muestra resultante. Por último, se eluyó con Tampón de Elución Gns-Gcs, a un flujo de 0,5 mL/min. Todas las muestras colectadas fueron posteriormente analizadas mediante *SDS-PAGE* teñido con Azul de Coomasie y *Western Blot*. Finalmente, fue realizada la cuantificación del antígeno recombinante.

#### **2.2.6.2.8. Replegamiento de Gns y Gcs mediante ultrafiltración**

Para el replegamiento de los antígenos Gns y Gcs, se empleó la fracción de elución obtenida desde la purificación mediante IMAC. Fue empleado el sistema de ultrafiltración Amicon Bioseparations Stirred Cells de 20 mL (Merck, Alemania), empleando un disco de ultrafiltración Ultracel de 5KDa (Merck, Alemania). Se acopló el sistema a una bomba P1, para realizar el replegamiento en paralelo a la ultrafiltración. Durante todo el procedimiento se mantuvo la temperatura del cuarto a 16°C. El sistema de ultrafiltración se llenó con 25 mL de la fracción eluída de la purificación mediante IMAC, terminando de llenar con ayuda de la bomba P1. Se comenzó a pasar Tampón de Replegamiento Gns-Gcs a la muestra. Se mantuvo un flujo de aproximadamente 50 µL/minuto. Se emplearon en total 4 a 5 volúmenes de Tampón de Refolding. Posteriormente y sin abrir el sistema, se cambió el Tampón de Replegamiento Gns-Gcs por Tampón de Inmunización Gns-Gcs. Se realizó el cambio de tampón de la misma forma descrita para el replegamiento, empleando en total 4 a 5 volúmenes de Tampón de Inmunización Gns-Gcs. Una vez finalizado, se detuvo el bomba, se abrió el sistema Amicon y con mucho cuidado se recuperó la fracción retenida en Buffer de Inmunización. Se agregó Tween 20 a la muestra hasta una concentración de 0,02% v/v.

La muestra final fue posteriormente analizadas mediante *SDS-PAGE* teñido con Azul de Coomasie y *Western Blot*. Finalmente, fue realizada la cuantificación del antígeno recombinante. Los antígenos replegados fueron almacenados en alícuotas de 1 mL a -80°C hasta el momento de su uso.

### **2.2.6.3. Obtención del antígeno recombinante AndesVac**

#### **2.2.6.3.1. Diseño de antígeno multi-epítipo AndesVac basado en las proteínas Gn, Gc y N de Virus Andes**

##### **2.2.6.3.1.1. Predicción de epítipes de células B presentes en las glicoproteínas de envoltura Gn y Gc de Virus Andes**

Para determinar posibles epítipes de células B se analizó la secuencia aminoacídica del precursor de las glicoproteínas de envoltura de Virus Andes (GPC) (UniProtKB: Q80DP7), utilizando el software predictivo BCPREDS para seres humanos (EL-Manzalawy et al., 2008). Los epítipes se clasificaron mediante un score en base a la flexibilidad, hidrofobicidad y/o accesibilidad de sus residuos. Se seleccionaron aquellos epítipes que clasificaban mejor según el score obtenido. La presencia del aminoácido cisteína en la secuencia de los epítipes se usó como criterio de exclusión. Los epítipes obtenidos se cotejaron con información publicada en literatura de mapeos epitópicos usando bibliotecas de péptidos solapantes. Así, se seleccionaron como epítipes B de Gn y Gc de virus Andes aquellos péptidos que además de ser predichos por herramientas bioinformáticas, han sido descritos como epítipes B experimentalmente en pacientes (Arikawa et al., 1989; Heiskanen et al., 1999; Hjelle et al., 1994; Wang et al., 1993).

##### **2.2.6.3.1.2. Predicción de epítipes de célula T presentes en la proteína NP de la nucleocápside de Virus Andes**

Para la identificación de epítipes de células T, se realizó un análisis de homología, realizando alineamientos entre la nucleoproteína de virus Andes (UniProtKB: O36307) y epítipes T encontrados experimentalmente en *Hantavirus* del viejo mundo, descritos en trabajos previos (Ennis et al., 1997; Tuuminen et al., 2007; Van Epps et al., 2002), utilizando el software Clustal Omega (W. Li et al., 2015; McWilliam et al., 2013; Sievers et al., 2011) (European Bioinformatics Institute, European Molecular Biology Laboratory).

### **2.2.6.3.1.3. Diseño del antígeno multi-epítipo AndesVac**

Se diseñó la molécula quimérica denominada AndesVac, consistente en epítopes B y epítopes T derivados de las proteínas del Virus Andes. Los epítopes fueron incorporados separados por un pentapéptido espaciador flexible (STSST). En el extremo N-terminal fue agregada la secuencia codificante para el ligando quimioquina C (XCL1) (UniprotKB: P47992). XCL1 corresponde a una molécula conocida como Linfotactina, que se encuentra asociada a la activación del sistema inmune y la quimio-atracción de linfocitos T (Dorner et al., 2009; Kelner et al., 1994; Kennedy et al., 1995; Lei & Takahama, 2012). Se adicionaron 6 residuos de histidina en el extremo C-terminal con la finalidad de facilitar su identificación y purificación por cromatografía de afinidad a iones metálicos (*Immobilized Metal-ion Affinity Chromatography*; IMAC). Las cisteínas presentes en los epítopes predichos fueron reemplazadas por residuos de alanina.

A partir de la secuencia aminoacídica descrita, fue diseñada la secuencia nucleotídica codificante para el antígeno AndesVac. Fue realizada una optimización de codones para su expresión en bacterias *E. coli*, se agregó una secuencia de término de lectura TAA en su extremo 3' y se adicionaron sitios de corte de las enzimas *NdeI* y *NaeI* en el extremo 5', y *Apal* y *XhoI* en el extremo 3'. El constructo fue sintetizado por la compañía GenScript (República Popular China) dentro del vector pET22b(+).

### **2.2.6.3.2. Crecimiento bacteriano y optimización de los parámetros de expresión de AndesVac**

#### **2.2.6.3.2.1. Determinación de la cepa bacteriana óptima para la expresión de AndesVac**

Se inocularon 50  $\mu$ L de glicerol de bacterias de las cepas BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Stratagene, EE.UU.) y SHuffle® T7 Express Competent *E. coli* (NEB, EE.UU.) transformadas con el plásmido pET-22b-AndesVac en un precultivo de 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Las bacterias fueron incubadas en agitación orbital a 37 °C durante 12 horas. Se tomó una muestra de 15  $\mu$ L de este cultivo, y fue inoculado en 5 mL de medio de cultivo LB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Las bacterias fueron nuevamente incubadas a 37°C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0.4–0.6. Se adicionó IPTG a una concentración de 0,4 mM, y los cultivos se crecieron durante 6 horas. Estos se centrifugaron a 6.000 rpm durante 10 minutos, se pesaron los precipitados húmedos, y se resuspendieron en tampón fosfato 50 mM pH 7,4.

Las bacterias fueron lisadas por sonicación empleando el sonicador Q700-CL334 (QSonica, EE.UU.). Las fracciones solubles e insolubles fueron separadas mediante centrifugación de las muestras sonicadas a 10.000 rpm durante 10 minutos. La expresión del antígeno recombinante AndesVac fue analizada en un gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomasie. El gel fue analizado por densitometría utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Para ello, se determinó la intensidad de la banda correspondiente a AndesVac, y se dividió por la intensidad de la banda a la altura de de AndesVac en el gel en el control transformado con el vector sin el gen de interés tratado bajo las mismas condiciones. Se realizó *Western Blot* de la electroforesis realizada para comprobar la expresión del antígeno recombinante.

#### **2.2.6.3.2.2. Determinación del medio de cultivo a utilizar para la expresión de AndesVac**

Se inocularon 50 µl de glicerol de bacterias transformadas con el plásmido pET-22b-AndesVac en un precultivo de 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100 µg/mL. Las bacterias fueron incubadas en agitación orbital a 37 °C durante 12 horas. Se tomó una muestra de 15 µL de este cultivo, y fue inoculado en 5 mL de diferentes medios de cultivo líquidos (LB, TB, SB y 2xYT) suplementados con ampicilina 100 µg/mL. Los cultivos fueron incubados a 37°C en agitación orbital hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.4–0.6.

Se adicionó IPTG a una concentración de 0,4 mM, y los cultivos se crecieron durante 6 horas. Posteriormente fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 10 minutos. Los precipitados húmedos fueron pesados y resuspendidos en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. La expresión del antígeno recombinante AndesVac fue analizada en un gel de poliacrilamida al 12%, aplicando en cada pocillo 30 µg de precipitado húmedo de cada condición de crecimiento. El gel fue teñido con Azul de Coomasie y analizado mediante densitometría utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Se determinó la intensidad de la banda correspondiente a AndesVac en cada condición de crecimiento, y se dividió por la intensidad de la banda a la altura de AndesVac en el gel en el control transformado con el vector sin el gen de interés tratado bajo las mismas condiciones.

#### **2.2.6.3.2.3. Determinación de la temperatura y tiempo de inducción óptimos para la expresión de AndesVac**

Se inocularon 50  $\mu$ L de glicerol de bacterias transformadas con el plásmido pET-22b-AndesVac en un precultivo de 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Fue incubado en agitación orbital a 37 °C durante 12 horas. Se tomó una muestra de 50  $\mu$ L de este cultivo, y fue inoculado en 200 mL de medio SB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. El cultivo fue incubado a 37°C en agitación orbital hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,4–0,6. Se adicionó IPTG a una concentración de 0,4 mM, y los cultivos fueron crecidos en agitación orbital a 16 °C durante 48 horas o a 37 °C durante 8 horas. Fueron colectadas muestras de 1 mL: cada hora en el caso del cultivo a 37 °C, y cada 6 horas en el caso del cultivo a 16°C.

Estas muestras fueron centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos, se pesaron los precipitados húmedos, y se resuspendieron en  $H_2O_d$ . La expresión del antígeno AndesVac fue analizada en un gel de poliacrilamida al 12% en cual fue aplicando en cada pocillo 30  $\mu$ g de precipitado húmedo de cada condición de crecimiento. El gel fue teñido con Azul de Coomasie, y analizado mediante densitometría utilizando el software ImageJ(Schneider et al., 2012). Fue determinada la intensidad de la banda correspondiente al antígeno AndesVac en cada condición de crecimiento, y se dividió por la intensidad de la banda a la altura de AndesVac en el gel correspondiente el control transformado con el vector sin el gen de interés tratado bajo las mismas condiciones.

#### **2.2.6.3.2.4. Determinación de la concentración de inductor óptima para la expresión de AndesVac**

Se inocularon 50  $\mu$ L de glicerol de bacterias transformadas con el plásmido pET-22b-AndesVac en un precultivo de 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Fue incubado en agitación orbital a 37 °C durante 12 horas. Se tomó una muestra de 15  $\mu$ L de este cultivo, y fue inoculado en 5 mL de medio SB líquido suplementado con ampicilina 100  $\mu$ g/mL. Los cultivos fueron incubado a 37 °C en agitación orbital hasta alcanzar una  $D.O_{600}$  de 0,4–0,6. Se adicionó IPTG a concentraciones finales de 0,1, 0,4, 1 y 4 mM, y los cultivos se crecieron en agitación orbital a 37°C durante 3 horas. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 10 minutos, se pesaron los precipitados húmedos, y se resuspendieron en  $H_2O_d$ .



La expresión del antígeno AndesVac fue analizada en un gel de poliacrilamida al 12% en cual fue aplicando en cada pocillo 30 µg de precipitado húmedo de cada condición de crecimiento. El gel fue teñido con Azul de Coomasie, y analizado mediante densitometría utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Fue determinada la intensidad de la banda correspondiente al antígeno AndesVac en cada condición de crecimiento, y se dividió por la intensidad de la banda a la altura de AndesVac en el gel correspondiente el control transformado con el vector sin el gen de interés tratado bajo las mismas condiciones.

#### **2.2.6.3.2.5. Determinación del efecto de aditivos de cultivo para la expresión de AndesVac**

Se inocularon 50 µl de glicerol de bacterias transformadas con el plásmido pET-22b-AndesVac en un precultivo de 5 mL de medio LB líquido suplementado con ampicilina 100 µg/mL. Fue incubado en agitación orbital a 37 °C durante 12 horas. Se tomó una muestra de 15 µl de este cultivo, y fue inoculado en 5 mL de medio SB líquido suplementado con ampicilina 100 µg/mL y distintos aditivos documentados en bibliografía para el aumento de la expresión y solubilidad de proteínas heterólogas (Etanol, Glicerol, Sorbitol, Sacarosa, Glucosa, DTT, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>3</sub>) (Chhetri et al., 2015; Georgiou & Valax, 1996; Hemmerich et al., 2017; Lee, 1996; Rosano & Ceccarelli, 2014; Sandén et al., 2003; Strandberg & Enfors, 1991; Swartz, 2001; Weickert et al., 1996). Los cultivos fueron incubados en agitación orbital a 37 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600</sub> de 0,4–0,6. Se adicionó IPTG a una concentración de 0,4 mM, y los cultivos se crecieron en agitación orbital a 37°C durante 3 horas. Luego, los cultivos fueron centrifugados a 6.000 rpm durante 10 minutos, se pesaron los precipitados húmedos, y se resuspendieron en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. La expresión de AndesVac se analizó en un gel de poliacrilamida al 12% aplicando en cada pocillo 30 µg de células de cada condición de crecimiento. El gel fue teñido con Azul de Coomasie, y analizado mediante densitometría utilizando el software ImageJ (Schneider et al., 2012). Fue determinada la intensidad de la banda correspondiente al antígeno AndesVac en cada condición de crecimiento, y se dividió por la intensidad de la banda a la altura de AndesVac en el gel correspondiente el control transformado con el vector sin el gen de interés tratado bajo las mismas condiciones.

### **2.2.6.3.3. Extracción y solubilización del antígeno AndesVac**

#### **2.2.6.3.3.1. Determinación del efecto de las condiciones de solubilización de AndesVac**

Se realizó un análisis de distintas condiciones de lisis bacteriana para determinar aquellas capaces de favorecer la solubilización del antígeno AndesVac o bien de obtener el antígeno insoluble con la menor pérdida y mayor limpieza posible. Fueron empleados los tampones indicados en la Tabla MM1: Tampón acetato 50 mM (pH 4,0 y 5,0), tampón fosfato 50 mM (pH 6,0 y 7,0), tampón Tris/HCl 50 mM (pH 8,0 y 9,0), usando los siguientes aditivos, detergentes (Tritón x-100 o Tween-20, al 0.2%(v/v)), sales (Cloruro de Sodio y Cloruro de Potasio) a concentraciones de 0.1, 0.5 o 1 M, Glicerol 10% y 30% (v/v), Urea 1M a 8M, DTT 5 mM, Metales (CuSO<sub>4</sub> y FeCl<sub>3</sub>) 10 mM, cofactores (MgSO<sub>4</sub> y CaCl<sub>4</sub>) 10 mM, Glucosa y Sacarosa al 5%) (Burgess, 2009; Cabrita & Bottomley, 2004; Fahnert et al., 2012; Misawa & Kumagai, 2000; Patra et al., 2000; Rudolph & Lilie, 1996; A. Singh et al., 2015; S. M. Singh & Panda, 2005; Tsumoto et al., 2003; Vincentelli et al., 2009). La lisis fue realizada empleando lisozima y 5 ciclos de congelación-descongelación rápida, en tampón fosfato 50 mM, pH 7,4 y NaCl 0,1 M. Fueron separadas las fracciones solubles e insolubles por centrifugación, y posteriormente analizadas por *Dot Blot* de proteínas usando un anticuerpo anti-poli-His como anticuerpo primario.

#### **2.2.6.3.3.1.1. Solubilización de fracciones insolubles de AndesVac**

Se realizó un proceso de limpieza de las fracciones insolubles antes de ser solubilizadas. Para ello, se resuspendieron los precipitados insolubles en soluciones de lavado y fueron sonicados en un sonicador Q700-CL334 (QSonica, EE.UU.), con un vástago de 12.7 mm, durante 3 minutos por 1 segundo con 3 segundos de descanso (5 veces, distintas soluciones de lavado): Se hizo un lavado con un detergente (Tritón x-100 al 0.2% (v/v)), dos lavados con agua destilada para remover el detergente, y dos lavados con una solución de NaCl 1M y se separaron las fracciones solubles e insolubles por centrifugación. Se solubilizó el precipitado restante en tampón acetato 50 mM pH 5,0, Tritón X-100 2% (v/v), NaCl 0,5 M, Glicerol 30% (v/v), CaCl<sub>2</sub> 10 mM, Urea 4 M. El resultado fue analizado por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con Azul de Coomasie y *Western Blot*. La muestra solubilizada fue almacenada a -20°C hasta el momento de su uso.

#### **2.2.6.3.4. Purificación de AndesVac mediante cromatografía de afinidad a iones metálicos (IMAC)**

Para la purificación del antígeno AndesVac se emplearon 10 mL de matriz Chelating Sepharose Fast Flow en una columna de cromatografía C16/20. La columna fue instalada en el equipo de purificación ÄKTASTART. La matriz fue cargada con iones níquel pasando 2 volúmenes (10 mL) de NiSO<sub>4</sub> 100 mM a un flujo de 1 mL/min. A continuación, fue lavada con 20 mL de agua miliQ. La matriz fue equilibrada con 8 volúmenes (40 mL) de tampón de equilibrio. Se cargó en la matriz la fracción solubilizada, conteniendo al antígeno AndesVac, a un flujo de 1,5 mL/minuto. Fueron colectadas las proteínas no adheridas a la matriz. Una vez pasada la muestra, la matriz fue lavada con tampón de equilibrio hasta observar una disminución de la absorbancia hasta un nivel basal.

Para determinar las condiciones óptimas de purificación, fue realizado un gradiente de imidazol de 0 a 300 mM en un volumen de 500 mL a una velocidad de 2 mL/min. Así, fueron determinadas las concentraciones de imidazol óptimas para lavado de las proteínas contaminantes y elución del antígeno AndesVac. En base a estos parámetros, la matriz fue lavada con Tampón de Lavado AndesVac a un flujo de 2 mL/min y se colectó la muestra resultante. Por último, se eluyó con Tampón de Elución AndesVac, a un flujo de 2 mL/min. Todas las muestras colectadas fueron posteriormente analizadas mediante *SDS-PAGE* teñido con Azul de Coomassie y *Western Blot*. Finalmente, fue realizada la cuantificación del antígeno recombinante. La fracción de elución fue almacenada a -20°C hasta el momento de su uso.

#### **2.2.6.3.5. Concentración y cambio de tampón del antígeno Andes Vac por ultrafiltración**

Las muestras correspondiente a la fracción de Elución conteniendo al antígeno AndesVac purificado por IMAC fueron concentradas y ultrafiltradas utilizando tubos Amicon Ultra-4 con tamaño de poro 10 kDa según las indicaciones del fabricante. Brevemente, muestras de 4 mL fueron puestas en el sistema, y se realizaron centrifugaciones sucesivas de 15 minutos a 3.900 x g en centrífuga refrigerada (4°C), hasta obtener 1 mL de concentrado de proteína. El proceso fue repetido hasta la concentración del volumen deseado. Posteriormente, se realizó el cambio de tampón de la muestra para que los antígenos estuviesen contenidos en Tampón de Inmunización AndesVac. La muestra fue guardada en alícuotas de 1 mL a -80°C hasta el momento de su uso.

## **2.2.7. Validación inmunológica de los antígenos recombinantes**

### **2.2.7.1. Métodos generales empleados en los ensayos de inmunización**

#### **2.2.7.2. Formulaciones vacunales**

Los ensayos de inmunización se realizaron usando 6 formulaciones vacunales preparadas con adyuvante incompleto de Freund o con Hidróxido de aluminio. Las preparaciones empleadas se describen a continuación:

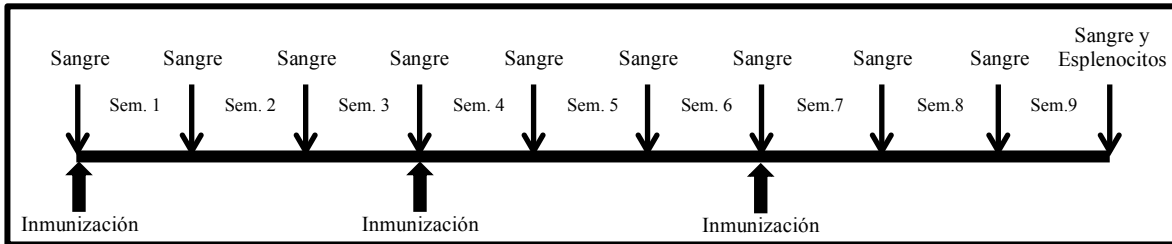
- Formulación 1: Adyuvante incompleto de Freund (AIF) + PBS (1:1).
- Formulación 2: Hidróxido de aluminio (AlOH) + PBS (1:1).
- Formulación 3: AIF + Gn-Gc (20 µg) (1:1).
- Formulación 4: AlOH + Gn-Gc (20 µg) (1:1).
- Formulación 5: AIF + AndesVac (20 µg) (1:1).
- Formulación 6: AIF + AndesVac (20 µg) (1:1).

#### **2.2.7.2.1. Mantenimiento y cuidado de los animales**

Se emplearon 30 hámsteres sirios hembras entre 8 y 10 semanas de edad. Los animales fueron distribuidos al azar en 6 grupos experimentales de 5 hámsteres cada uno. Cada grupo fue distribuido en jaulas independientes y tratados bajo los mismos cuidados. Se les administró agua y comida *ad libitum*, y fueron mantenidos en condiciones controladas de temperatura (25°C) en habitaciones con aire filtrado y ciclos de luz/oscuridad de 12 horas. Todos los procedimientos realizados cuentan con la autorización del Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad de Concepción (Anexo 1).

#### **2.2.7.2.2. Inmunización de hámsteres sirios con los antígenos recombinantes**

A cada grupo experimental se le administró una de las distintas formulaciones mencionadas anteriormente. Las inmunizaciones se realizaron en los días 1, 21 y 42 por inyección subcutánea dorsal con 100 µL de la formulación correspondiente al grupo experimental. A cada grupo se le tomaron muestras de sangre semanalmente hasta el día 63 (semana 9). Este día, los animales fueron sacrificados y se les extrajo los esplenocitos para la evaluación de la respuesta inmune celular. La Figura MM1 muestra el esquema de inmunización y toma de muestras seguido durante el experimento.



**Figura MM1: Esquema de inmunización de *M. Auratus*.**

#### **2.2.7.2.3. Obtención de muestras de plasma desde animales inmunizados**

Para la toma de muestras sanguíneas, los hámsteres fueron anestesiados con isoflurano. Fueron tomadas muestras de 300-500  $\mu$ L por punción de la vena retro-orbital empleando capilares heparinizados. Las muestras de sangre fueron colectadas en microtubos y posteriormente centrifugadas a 8.000 x g durante 15 minutos. El plasma fue aspirado y alicuotado en microtubos limpios, los cuales fueron conservados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### **2.2.7.2.4. Determinación del título de anticuerpos IgG totales mediante ELISA**

La determinación de anticuerpos IgG totales contra cada uno de los antígenos se determinó mediante ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Engvall & Perlmann, 1971). La proteína a detectar fue diluida en tampón de recubrimiento a una concentración de 10  $\mu\text{g/mL}$ . Para el recubrimiento de las placas fue empleado el antígeno correspondiente, Gns y Gcs o AndesVac, utilizando 1  $\mu\text{g}$  de antígeno por pocillo. Esta preparación fue empleada para el recubrimiento de placas de 96 pocillos de alta unión a proteínas. La placa fue incubada durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Al día siguiente, fue eliminado tampón de recubrimiento y las placas fueron lavadas 2 veces con solución de lavado de ELISA. Las placas fueron llenadas con solución de bloqueo de ELISA e incubadas por 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Posteriormente, las placas fueron lavadas 3 veces con solución de lavado de ELISA. Inmediatamente, los pocillos de las placas fueron incubados con diluciones seriadas de plasmas de hámsteres inmunizados con el antígeno correspondiente, preparadas en solución de dilución, durante 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Pasado este tiempo, las placas fueron nuevamente lavadas con solución de lavado y las placas fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-Hámster conjugado a HRP, preparado en solución de dilución, durante 1 hora a  $37^{\circ}\text{C}$  en cámara húmeda. Las placas fueron lavadas e incubadas con solución sustrato a temperatura ambiente durante 20 minutos, en cámara húmeda y en oscuridad.

La reacción fue detenida adicionando solución de detención a cada pocillo. Fue medida la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 492 nm, en el lector de placas SpectroStar NANO (BMG LabTech, Alemania). El ensayo fue realizado por triplicado. Se consideró positivos aquellos pocillos cuya D.O. fuese dos o más veces mayor que la D.O. observada el día cero para la misma dilución en el mismo grupo experimental.

#### **2.2.7.2.5. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes**

##### **2.2.7.2.5.1. Construcción de vector lentiviral seudotipado con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes**

##### **2.2.7.2.5.2. Diseño y síntesis del vector conteniendo las secuencias de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes**

Fue diseñado un plásmido conteniendo la secuencia nucleotídica del precursor de las glicoproteínas (GPC) de virus Andes cepa Chile-971786 (UniProtKB ID: Q9E006). La secuencia fue analizada y modificada para eliminar sitios potenciales de *splicing*, corte, terminación temprana de la transcripción y de poliadenilación. Se optimizó el uso de codones para su expresión en células de mamíferos, y fue clonada en el plásmido pCMV6-Entry (Origene, EE.UU.). Su síntesis fue realizada por la empresa BlueHeron (EE.UU.), dando origen al plásmido pEntry-GPC. Este plásmido permite la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en células de mamíferos.

##### **2.2.7.2.5.2.1. Inmunofluorescencia para evaluar el plásmido pEntry-GPC**

Fueron sembradas  $5 \times 10^4$  células HEK293-FT en placas de cultivo de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos circulares. Al día siguiente, las células fueron transfectadas mediante el método anteriormente descrito. En este experimento, fue empleado el plásmido pEntry-GPC para la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc, y el plásmido pENTRY-FSH como control. Posteriormente, las células fueron incubadas por 48 horas para permitir la expresión de proteínas. Pasado este tiempo, las células fueron fijadas con PFA 4% por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron lavadas 3 veces con PBS durante 5 minutos, y tratadas con la solución de permeabilización (Tritón 0,2%) por otros 5 minutos. Las células fueron nuevamente lavadas 3 veces con PBS e incubadas con buffer de bloqueo (BSA 1%) durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, las células fueron lavadas 3 veces con PBS e incubadas con los anticuerpos primarios (Anti-Gn o Anti-Gc) a una dilución 1/200 durante 16 horas a 4°C.

Seguidamente fueron lavadas nuevamente e incubadas con el anticuerpo secundario (anti-mouse conjugado con FITC) por 4 horas a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron lavadas y los cubreobjetos con las células fueron montados en portaobjetos con 7  $\mu$ l de medio de montaje Vectashield.

#### **2.2.7.2.5.2.2. Producción de vectores lentivirales**

Para la producción de los vectores lentivirales fue usado el kit comercial ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen) según las instrucciones descritas en el manual del fabricante. Para la producción viral fueron usadas 10 placas de cultivo celular de 100 mm de diámetro, sembrándose 100.000 células HEK293-FT en cada una. Las células fueron crecidas hasta una confluencia del 70-80%. En ese punto, fueron transfectadas según el método de transfección con PEI descrito anteriormente. Fueron utilizados 4  $\mu$ g de los plásmidos pLP1 y pLP2, 8  $\mu$ g del plásmido pLGW y 4  $\mu$ g de los plásmidos pLP/VSVG o pEntry-GPC según corresponda. El plásmido pLP/VSVG fue utilizado para la generación de los vectores virales control, que expresan en su superficie la proteína G del virus de la Estomatitis Vesicular. En tanto, el plásmido pEntry-GPC fue utilizado para la producción de los vectores virales pseudotipados, que expresen en su superficie las glicoproteínas Gn y Gc del virus Andes. Luego de 48 horas fue colectado el sobrenadante de cultivo y a partir de él fueron concentrados los vectores lentivirales.

#### **2.2.7.2.5.2.3. Concentración de vectores lentivirales**

Para la concentración de los vectores lentivirales producidos según lo señalado anteriormente, fue utilizado el sobrenadante del cultivo celular (Reiser, 2000). Fue centrifugado a 3.000 rpm durante 20 minutos para precipitar células y debris celular. El sobrenadante de centrifugación fue posteriormente filtrado a través de filtros de PVDF (polifluoruro de vinilideno) con tamaño de poro de 0,45  $\mu$ m. El filtrado fue centrifugado a 100.000 x g durante 90 minutos en ultracentrífuga Sorvall Ultra WX 80 (Thermo Scientific, EE.UU.). Finalmente, el sobrenadante de ultracentrifugación fue cuidadosamente aspirado y eliminado. El precipitado conteniendo los vectores lentivirales fue resuspendido en 300  $\mu$ L de DMEM incubándolo a 4°C durante 16 horas.

#### **2.2.7.2.5.2.4. Transducción de células con vectores lentivirales seudotipados**

Para los ensayos de transducción de células fueron usadas placas de cultivo de 96 pocillos, sembrándose 10.000 células en cada pocillo. Fueron empleadas células HEK293 y HEK293-iβ3. Al día siguiente, las células fueron incubadas con 10 μL del concentrado del vector lentiviral pseudotipado con Gn y Gc. 24 horas post infección, el medio de cultivo fue cambiado y 48 horas más tarde fue observada la presencia de células fluorescentes en el microscopio.

#### **2.2.7.2.5.2.5. Titulación de vectores lentivirales**

La titulación los vectores lentivirales seudotipados se efectuó en placas de 96 pocillos con células HEK293-iβ3 a 60-80% de confluencia. A partir de una dilución inicial de la muestra de 1 en 40 se efectuaron 11 diluciones sucesivas en base 5. Empleando 50 μL de cada una de estas 12 diluciones se infectó las células de cada pocillo. Las células infectadas se incubaron 72 horas y pasado este tiempo se contó en microscopio de fluorescencia (Nikon, Japón) el número de células verdes en la última dilución en la que estas eran visibles. Se definió como una partícula viral o unidad formadora de color (UFC) a cada célula fluorescente en la última dilución donde se visualizaba al menos una de estas. Se consideró tanto el número de células como las diluciones y el volumen inicial para expresar el título viral en UFC/mL. Cada titulación se efectuó por triplicado y el título obtenido corresponde al promedio de las determinaciones. Se utilizó como control negativo células no infectadas.

#### **2.2.7.2.5.3. Obtención del título de anticuerpos neutralizantes**

Los títulos de anticuerpos neutralizantes (AcN) fueron determinados usando el vector lentiviral seudotipado con las proteínas Gn y Gc del virus Andes descrito anteriormente. Para ello, el vector lentiviral fue previamente titulado en la línea celular HEK-293-iβ3. Antes de utilizarse en el ensayo de seroneutralización, las muestras de plasma fueron inactivadas a 56°C por 25 minutos, y posteriormente se hicieron diluciones seriadas en base 2, por triplicado. Fueron tomados 50 μL de cada dilución y se le añadieron 50 μL conteniendo  $10^2$  partículas infectivas del vector lentiviral seudotipado con Gn y Gc. Las mezclas fueron incubadas a 37°C durante 1 hora. Pasado este tiempo, fueron adicionadas a un cultivo de células HEK293-iβ3 sembradas 24 horas antes, en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $2.5 \times 10^4$  células por pocillo.



La placa fue incubada a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Pasado este tiempo, la placa fue observada en un microscopio de fluorescencia, realizando el conteo de las células infectadas. El título de anticuerpos neutralizantes fue definido como la última dilución de plasma que neutralizó las 10<sup>2</sup> partículas infectivas del vector lentiviral seudotipado con Gn y Gc.

#### **2.2.7.2.6. Evaluación del perfil de citoquinas de esplenocitos**

Los esplenocitos extraídos a cada hámster fueron divididos y sembrados en dos pocillos en una placa 24 pocillos (40 pocillos en total). Uno de los pocillo fue estimulado por 24 horas con el complejo antigénico Gns/Gcs a un concentración de 1 µg/mL, mientras que el otro pocillo no recibió estimulación. Pasadas la 24 horas, las células fueron procesadas usando el kit de reactivos Rneasy Micro Kit (Qiagen, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante. Posteriormente, el ARN purificado fue empleado para evaluar la expresión relativa de citoquinas involucradas en un perfil de Linfocitos T helper, empleando el kit Power SYBR Green Cells-to-CT (ThermoFischer Scientific, EE.UU.). Fueron empleados oligonucleótidos específicos para los genes IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-6. Como normalizador se empleó la proteína ribosomal L18. Los PCR cuantitativos se realizaron en un equipo AriaMx 96 Real-Time PCR System (Agilent). Las diferencias relativas entre los niveles de ARN de cada citoquina en los esplenocitos estimulados, con respecto a los no estimulados, fueron determinadas mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001; Wong & Medrano, 2005).

**Tabla MM3: Partidores empelados para la evaluación de cambios en los niveles relativos de ARNm de citoquinas en hámster mediante RT-qPCR.**

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Partidor (5`-3')</b>	<b>Hebra</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	GamF	<i>CATCAAGGCAGACCTGTTTGCTAAC</i>	<i>Forward</i>
	GamR	<i>CGCTGAACCTGAAGGTCATTTACC</i>	<i>Reverse</i>
<b>IL-12</b>	IL12F	<i>CTGGACGAGCCCATGCTGAC</i>	<i>Forward</i>
	IL12R	<i>GTAGGGATCCGCTTCTGCCAG</i>	<i>Reverse</i>
<b>IL-4</b>	IL4F	<i>ACCCTGTGCTTGAAGAACAATTCCAG</i>	<i>Forward</i>
	IL4R	<i>TGGA CT CATT CAC ATT GCAGCTCTTC</i>	<i>Reverse</i>
<b>IL-6</b>	IL6F	<i>CAAAGCCAGAGTCATTCAGAGCAC</i>	<i>Forward</i>
	IL6R	<i>CAGGATGGCCTTGGAGGTTGG</i>	<i>Reverse</i>
<b>Proteína Ribosomal L18</b>	Rib18F	<i>TGACGTGAGGATTCTCGAAGTGC</i>	<i>Forward</i>
	Rib18R	<i>CTGGTCAAAGGTGAGGATCTTGC</i>	<i>Reverse</i>

### 2.2.7.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos de los ensayos de inmunización en hámsteres sirios fue realizado con el Software GraphPad Prism version 6.00 para Mac (GraphPad Software, La Jolla California, EE.UU; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Para ello, se empleó un ANOVA de dos vías, seguido de test de Dunnet de múltiple comparación o de test de Bonferroni de múltiple comparación.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en células de mamíferos

El objetivo principal de nuestro proyecto consiste en la expresión de antígenos basados en las proteínas del virus Andes para su uso como candidato vacunal. Inicialmente, decidimos realizar la expresión de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en células de mamífero. Para ello, se realizó el diseño bioinformático de las secuencias codificantes de estas variantes, denominadas sGn y sGc, a partir de la secuencia aminoacídica de GPC (UniProtKB ID: Q9E006) de virus Andes cepa Chile-971786. Se seleccionaron los ectodominios de Gn y Gc, eliminando las regiones transmembrana y citoplasmáticas predichas con el programa TMHMM 2.0 (Sonnhammer et al., 1998) (Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark, Dinamarca) y las secuencias consenso de retención en compartimentos celulares predichas con el programa PSORT II Prediction (Nakai & Horton, 1999) (Human Genome Center at the Institute for Medical Science, University of Tokyo, Japón). Se confirmó la permanencia de los sitios potenciales de N-glicosilación (cuatro para Gn y uno para Gc) mediante el empleo del servidor NetNGlyc 1.0 (Gupta & Brunak, 2002) (Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark, Dinamarca). Procurando que las proteínas diseñadas fuesen secretadas al medio de cultivo, a cada una de las secuencias se les incorporó un péptido señal de secreción de eritropoyetina humana (UniProtKB ID: P01588) en su extremo N-terminal, mientras que en su extremo C-terminal se incorporó un péptido espaciador compuesto por 3 repeticiones de SGGGG seguido de una cola de 7 histidinas (Figura R1). El peso molecular teórico de las moléculas diseñadas corresponde a 44,4 KDa (punto isoeléctrico teórico 6,32) para sGn y 51,5 KDa (punto isoeléctrico teórico 6,19) para sGc.

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGELKMECPHTVGLGQGYIIGSTELGLISIEAASDIKLESS  
 CNFDLHTTSMAQKSFTQVEWRKKSDDTTTNAASTTFEAQTKTVNLRGTCILAPELYDTLKKVK  
 KTVLCYDLTCNQT HCQPTVYLIAPVLT CMSIRSCMASVFTSRIQVIYEKTHCVTGQLIEGQCFNPA  
 HTLTLSPAHTYDVTVLPISCFFTPCKSEQLKVIKTFEGILTKTGCTENALQGYVVCFLGSHSEPLI  
 VPSLEDIRSAEVVSRMLVHPRGEDHDAIQNSQSHLRIVGPITAKVPSTSSDTLKGTAFAAGVPMYS  
 SLSTLVRNADPEFVFSPGIVPESNHS TCDKKTVPITWTGYLPISGEMEKVTGCTVFCFLAGPGASC  
 EAYSENGIFNIS SPTCLV NKS GGGGSGGGGSGGGGLEHHHHHHH\*

MGVHECPAWLWLLLSLLSLPLGLPVLGTPLMESGWSDTAHGVGEIPMKTDELEDFSLPSSSYS  
 YRRKLTNPANKEESIPFHFQMEKQVIHAEIQPLGHWMDATFNKTAHFHCYGACQKYSYPWQTSK  
 CFFEKDYQYETGWGCNPGDCPGVGTGCTACGVYLDKLSVGKAYKIISLKYTRKVCIQLGTEQ  
 TCKHIDANDCLVTPSVKVCIVGTVSKLQPSDTLLFLGPLEQGGIILKQWCTTSCAFGDPGDIMSTP  
 SGMRCPEHTGSFRKICGFATTPVCEYQGNTISGYKRMMATKDSFQSF NLT EPHITTNKLEWIDPD  
 GNTRDHVNLVLRDVSFQDLSDNPCKVDLHTQAIEGAWGSGVGFTLTCTVGLTECPFSMFSIKA  
 CDLAMCYGSTVTNLRGNSNTVKVVGKGGHSGSSFKCCHDTDCSSEGLLASAPHLERVTGFNQI  
 DSDKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLSGGGGSGGGGSGGGGLEHHHHHHH\*

**Figura R1: Secuencia aminoacídica de las variantes soluble de Gn (sGn) y Gc (sGc).**

En rojo se presenta la señal de secreción de Eritropoyetina Humana, en verde el tag de histidinas, en turquesa la secuencia de sGn y en naranja la secuencia de sGc. En amarillo se resaltan los sitios potenciales de N-glicosilación.

La síntesis de los plásmidos conteniendo las secuencias génicas de las proteínas diseñadas fue realizado por la empresa BlueHeron (EE.UU.). Para ello, se realizó la optimización de condones de las secuencias nucleotídicas, eliminando potenciales sitios de *splicing* alternativo y término prematuro de la transcripción. Las secuencias fueron flanqueadas por sitios de corte para las endonucleasas *Nhe* I, *Bgl* II, *Xba* I y *EcoR* I. Cada una de las secuencias fue clonada dentro del vector de expresión en células de mamíferos pCMV6-Entry (OriGene, EE.UU.), los cuales fueron denominados pEntry-sGn y pEntry-sGc (Figura R2).

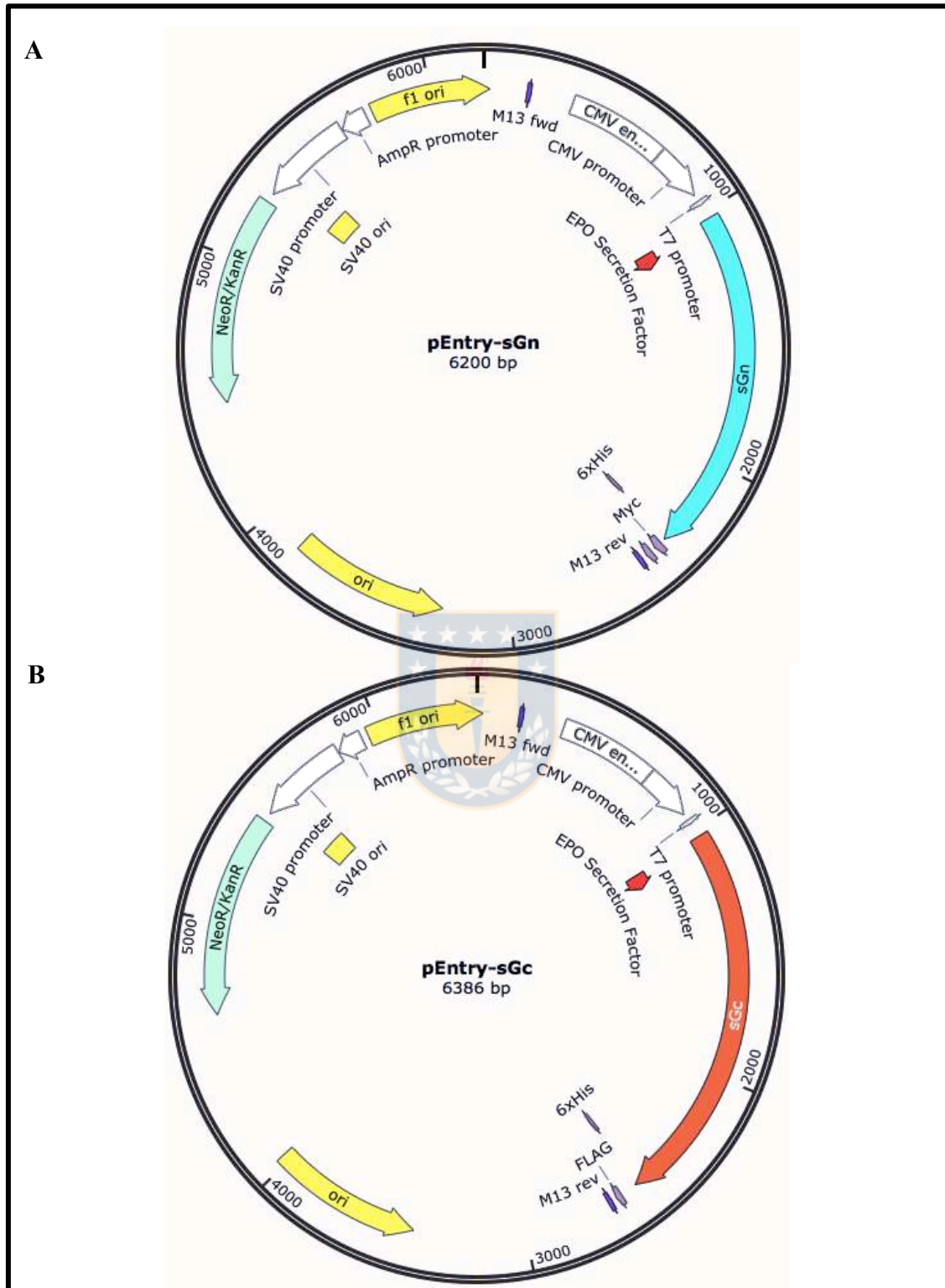
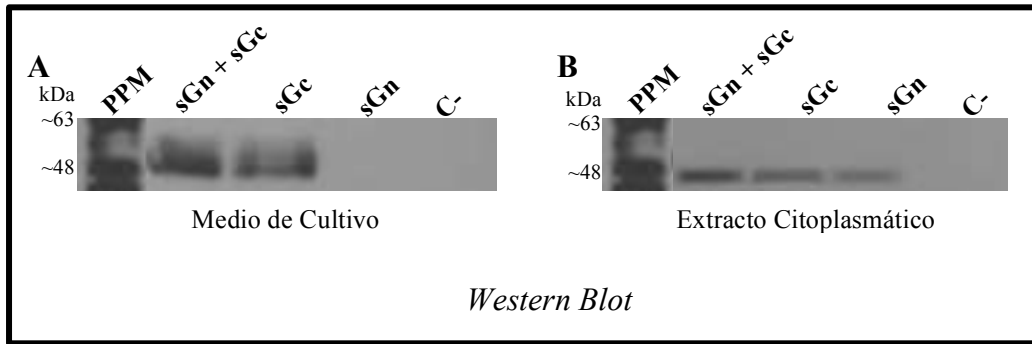


Figura R2: Constructos para la expresión de las variantes solubles de Gn (sGn) y Gc (sGc). **A. pEntry-sGn:** plásmido para la expresión de sGn en células de mamíferos. **B. pEntry-sGc:** plásmido para la expresión de sGc en células de mamíferos.

La funcionalidad de los plásmidos diseñados para la expresión de los antígenos sGn y sGc fue demostrada mediante transfección transciente con Polietilenimina (PEI) (Toledo et al., 2009) en células HEK293-FT con cada uno de los plásmidos y posterior detección por *Western Blot* tanto de las fracciones extracelulares como intracelulares. El ensayo mostró la presencia de bandas inmunorreactivas en los medios de cultivos de células transfectadas con el vector pEntry-sGc, y bandas inmunorreactivas mas tenues en su extracto citoplasmático que corresponderían a remanentes de la molécula sGc en el interior celular. En las células que fueron transfectadas con el vector pEntry-sGn se observó una banda inmunoreactiva tenue en la fracción correspondiente al extracto citoplasmático, lo cual sugiere que sGn podría estar siendo retenida en el interior de la célula productora (Figura R3).



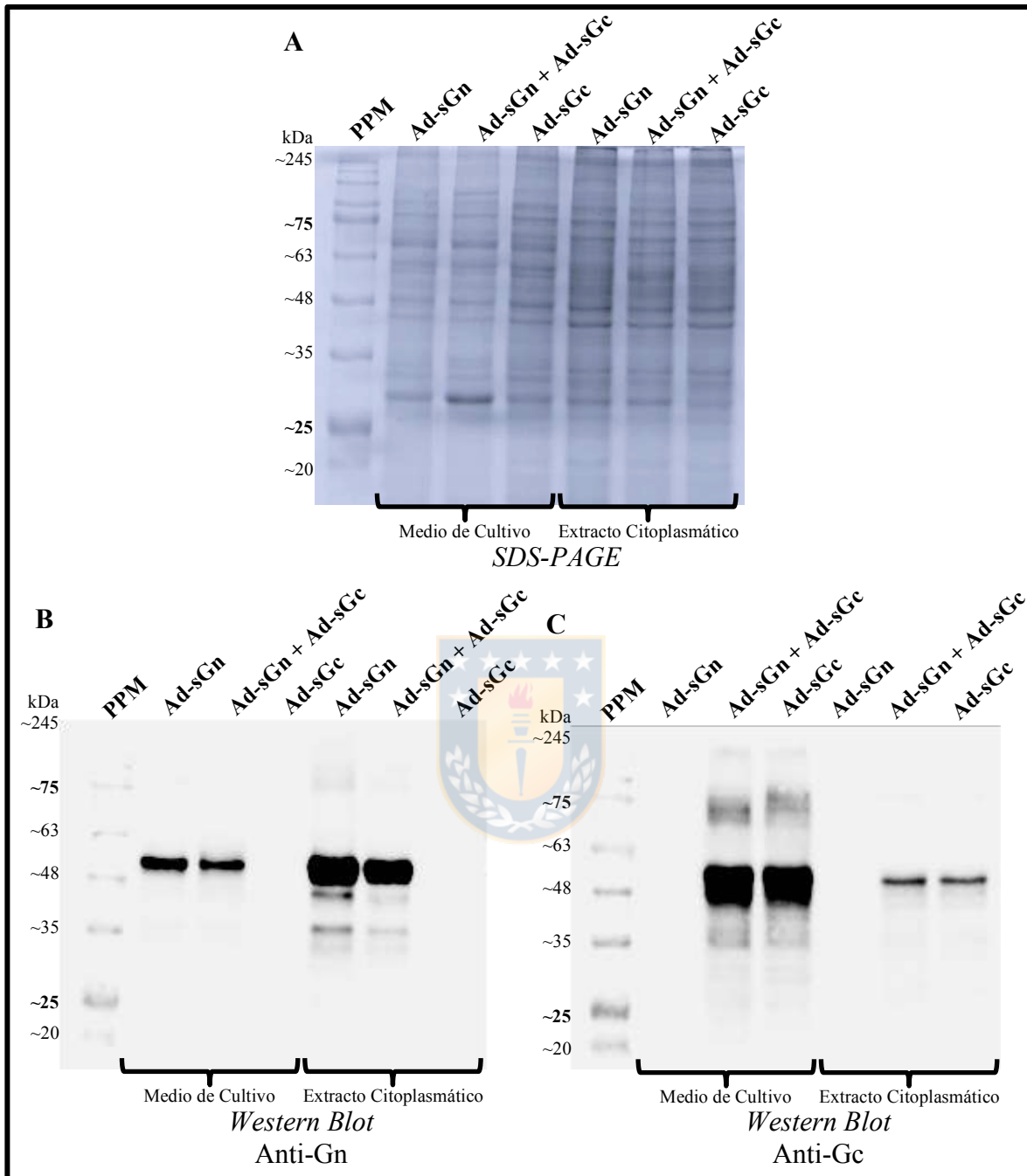


**Figura R3: Identificación de sGn y sGc en el medio extracelular y extracto citoplasmático de células HEK293-FT transfectadas con los constructos pEntry-sGn y pEntry-sGc. A. Western Blot** empleando anticuerpo primario Anti-poli-His del medio de cultivo de células HEK293 transfectadas. **B. Western Blot** empleando anticuerpo primario Anti-poli-His del extracto citoplasmático de células HEK293 transfectadas. **PPM.** Patrón de Peso Molecular. **sGn+sGc.** Células transfectadas con pEntry-sGn y pEntry-sGc. **sGc.** Células transfectadas con pEntry-sGc. **sGn.** Células transfectadas con pEntry-sGn. **C-.** Células transfectadas con plásmido control .



Como estrategia para la obtención de mayores niveles de expresión de los antígenos sGn y sGc, se decidió el empleo de vectores adenovirales (He et al., 1998) utilizando el sistema pAdEasy (Luo et al., 2007). Para ello, las secuencias codificantes para las moléculas sGn y sGc fueron clonados en el vector pAdTrack-CMV, bajo el control del promotor de citomegalovirus. Los vectores resultantes se denominaron pAdTrack-sGn y pAdTrack-sGc respectivamente. Cada uno de estos vectores fue linealizado y co-transfectado junto con el plásmido pAdEasy-1 en bacterias *E. coli* cepa BJ5187. La recombinación homóloga entre estos plásmidos permitió generar los vectores denominados pAdET-sGn y pAdET-sGc respectivamente. Ambos plásmidos fueron amplificados, purificados y digeridos empleando la endonucleasa de restricción *Pac I*. Los productos de esta digestión fueron empleados para la transfección de células HEK293, permitiendo la formación de los vectores adenovirales de interés, denominados Ad-sGn y Ad-sGc respectivamente. Ambos vectores adenovirales producidos fueron empleados posteriormente, tanto en separado como en conjunto, para la transducción de células SiHa. La expresión de los antígenos recombinantes sGn y sGc fue determinado mediante análisis por *SDS-PAGE* y Western Blot tanto del extracto citoplasmático como del medio de cultivo de las células transducidas (Figura R4). Estos ensayos permitieron evidenciar la expresión de ambas proteínas, con sGn permaniendo principalmente retenida intracelularmente y sGc secretada al medio de cultivo en su mayoría.

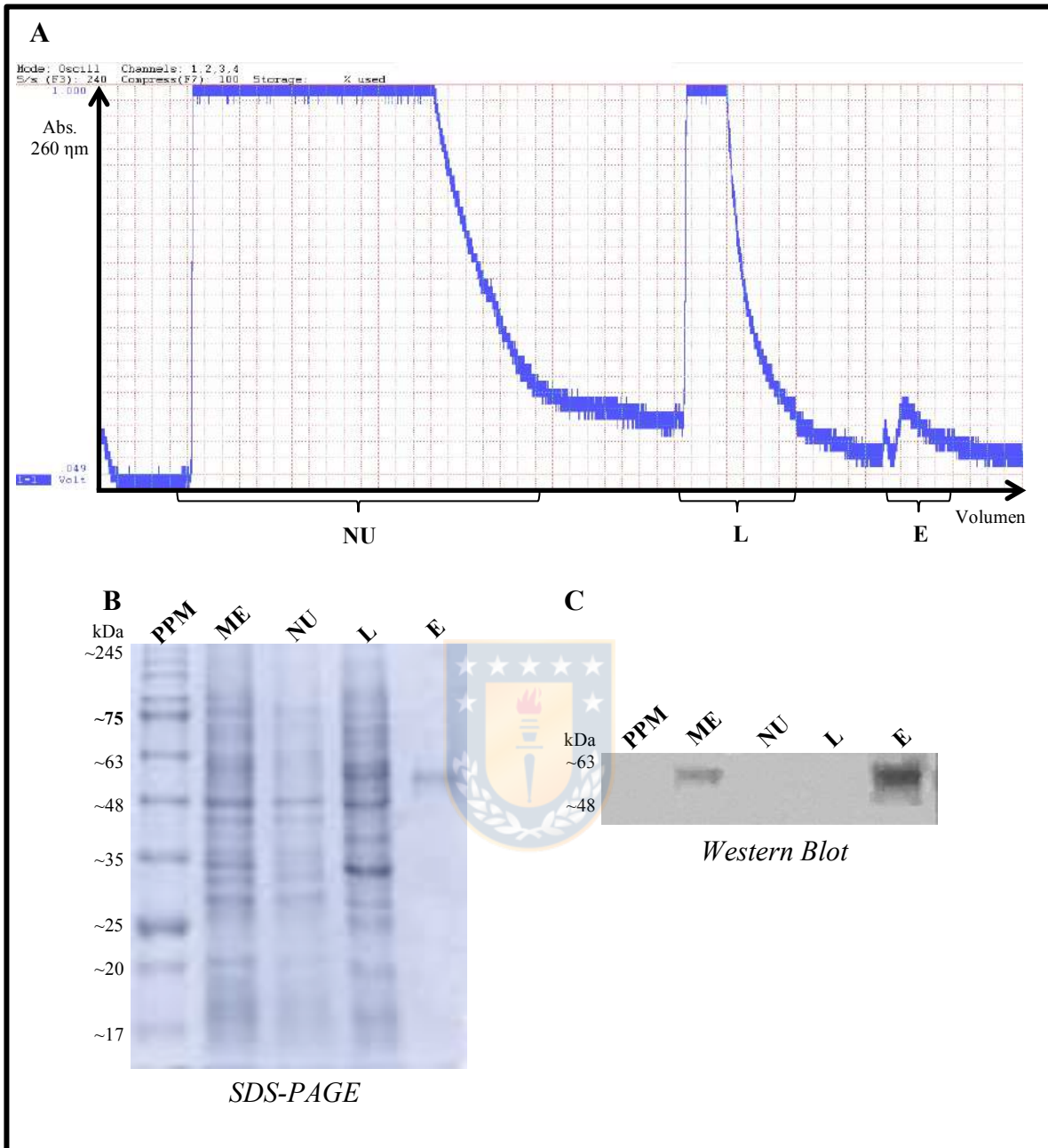




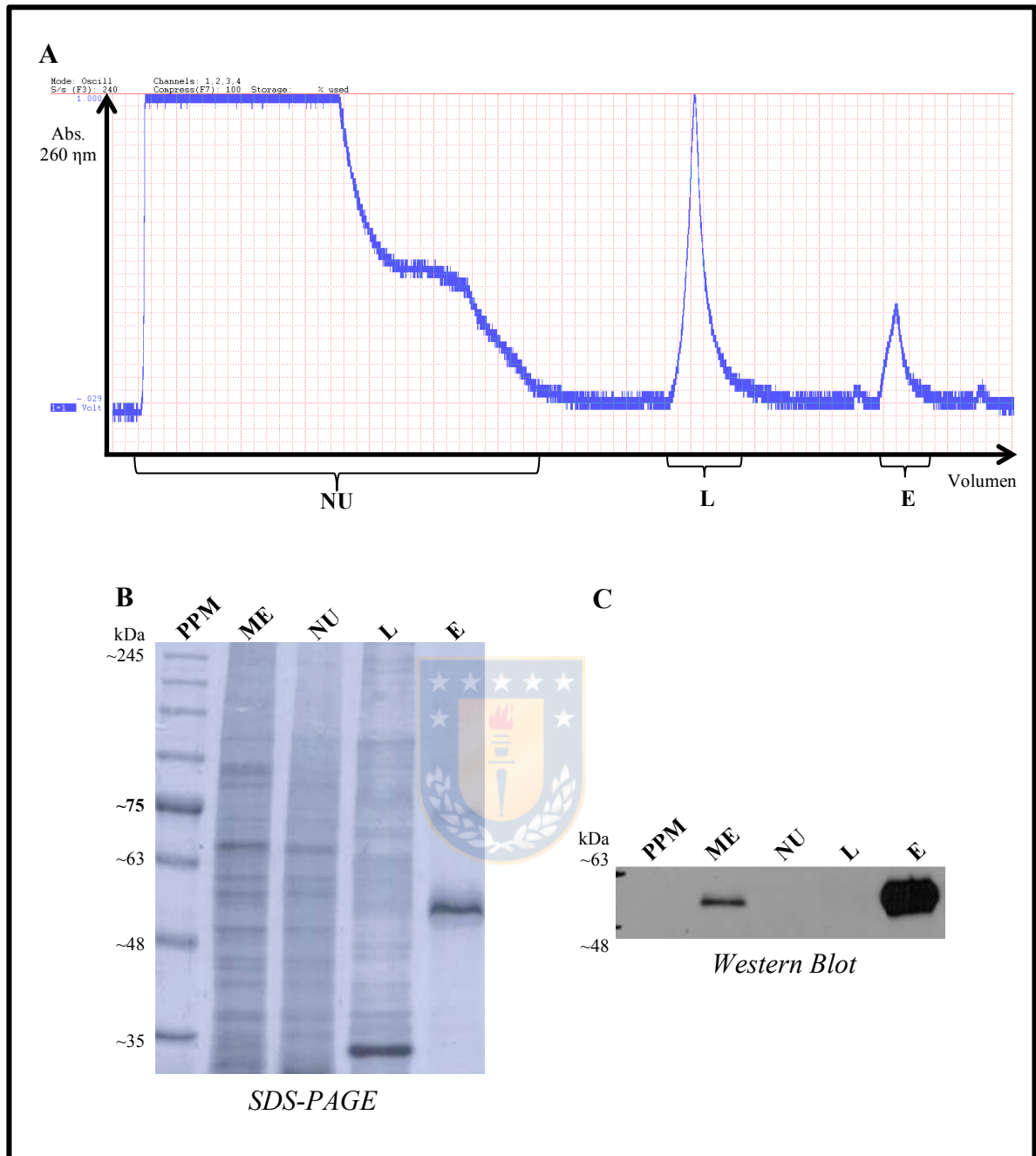
**Figura R4: Evaluación de la expresión y secreción de las variantes solubles de Gn y Gc del virus Andes en cultivos de células transducidas con los vectores adenovirales Ad-sGn y Ad-sGc. A. SDS-PAGE teñido con Azul de Coomassie. B. Western Blot empleando anticuerpo primario anti-Gn. C) Western Blot empleando anticuerpo primario anti-Gc. PPM. Patrón de Peso Molecular. Ad-sGn. Células transducidas con Ad-sGn. Ad-sGn + Ad-sGc. Células transducidas con Ad-sGn y Ad-sGc. Ad-sGc. Células transducidas con Ad-sGc.**

Posteriormente, se determinó la mejor multiplicidad de infección (*Multiplicity Of Infection*; MOI) para lograr la expresión óptima de los antígenos recombinantes. De estos ensayos, se determinó emplear un MOI de 70 y la producción separada de cada uno de los antígenos. Con los antígenos producidos en estas condiciones, se realizó la purificación de cada uno de ellos por cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (*Immobilized-Metal Affinity Chromatography*, IMAC). El antígeno sGn fue purificado desde el extracto citoplasmáticos de las células transducidas con el vector adenoviral Ad-sGn, mientras que el antígeno sGc fue purificado desde el medio de cultivo de las células transducidas con el vector adenoviral Ad-sGc. Se establecieron las mejores condiciones de purificación para cada uno de los antígenos mediante un gradiente de imidazol. Las condiciones establecidas permitieron la purificación del antígeno sGn con un 91% de pureza, según lo estimado por densitometría óptica de *SDS-PAGE* teñidos con Azul de Coomasie utilizando el Software ImageJ (Schneider et al., 2012), con un rendimiento de 14 µg/mL de extracto citoplasmático (Figura R5). Por otra parte, el antígeno sGc fue purificado con un 88% de pureza, según lo estimado por densitometría óptica de *SDS-PAGE* teñidos con Azul de Coomasie utilizando el Software ImageJ (Schneider et al., 2012), con un rendimiento de 2,59 µg/mL de medio de cultivo (Figura R6).



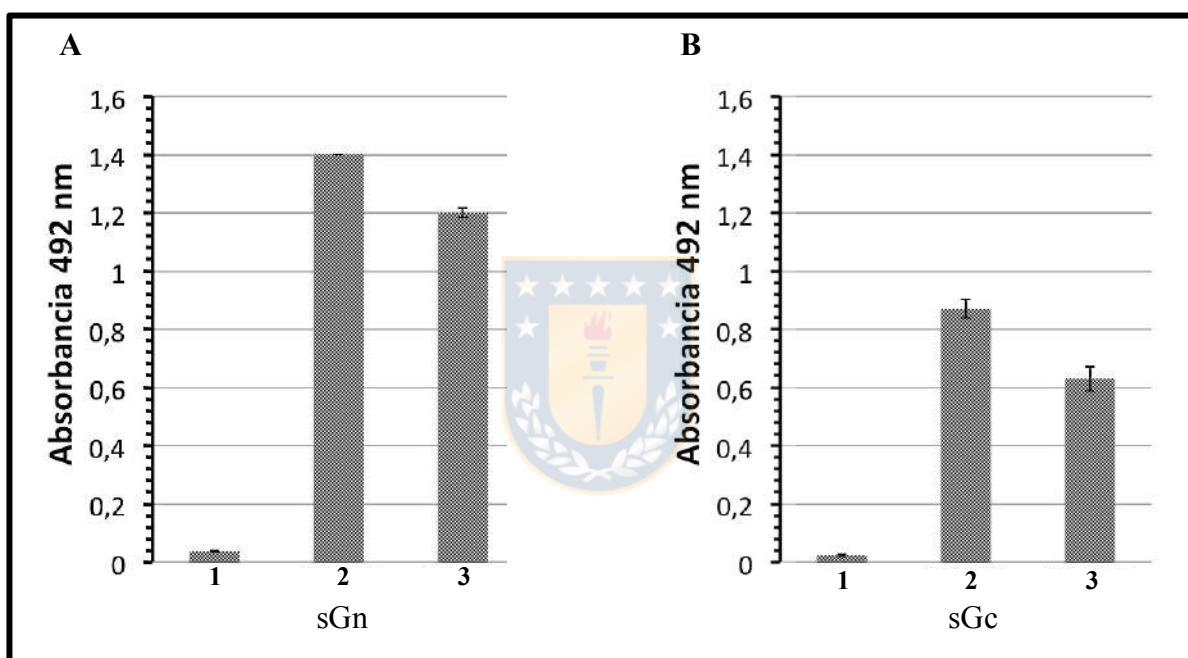


**Figura R5: Purificación de sGn a partir del extracto citoplasmático de células SiHa transducidas con Ad-sGn.** **A.** Cromatograma del proceso de purificación mediante IMAC, indicando la absorbancia a 260 nm en azul. **B.** *SDS-PAGE* teñido con Azul de Coomassie. **C.** *Western Blot* empleando anticuerpo primario anti-Gn. **PPM.** Patrón de Peso Molecular. **ME.** Extracto citoplasmático de células transducidas con Ad-sGn (Muestra de Entrada). **NU.** Fracción No-Unida **L.** Fracción Lavada. **E.** Fracción Eluída.



**Figura R6: Purificación de sGc a partir del medio de cultivo de células SiHa transducidas con Ad-sGc. A.** Cromatograma del proceso de purificación mediante IMAC, indicando la absorbancia a 260 nm en azul. **B.** SDS-PAGE teñido con Azul de Coomasie. **C.** Western Blot empleando anticuerpo primario anti-Gc. **PPM.** Patrón de Peso Molecular. **ME.** Medio de cultivo de células transducidas con Ad-sGc (Muestra de Entrada). **NU.** Fracción No-Unida **L.** Fracción Lavada. **E.** Fracción Eluída.

Finalmente, se realizaron ensayos para evaluar la inmunogenicidad de cada antígeno. Para ello, antígenos purificados fueron analizados mediante ELISA empleando como anticuerpos primarios sueros de pacientes sobrevivientes de SCPH (Figura R7). Este ensayo permitió demostrar que el suero de pacientes previamente infectados es capaz de reconocer a los antígenos sGn y sGc. Sin embargo, los resultados obtenidos no permiten el empleo de estos antígenos como candidatos vacunales debido a la cantidad de proteínas producidas según este método (Beltrán-Ortiz et al., 2017). Esto nos llevó a la búsqueda de otra alternativa para la producción de antígenos que pudiesen ser utilizados como candidato vacunal contra SCPH.



**Figura R7: Reconocimiento de las moléculas sGn y sGc por suero de pacientes previamente infectados con el virus Andes. A. Reconocimiento de antígeno sGn. B. Reconocimiento de antígeno sGc. 1. Suero control de donante sano. 2. Suero de paciente infectado 201201. 3. Suero de paciente infectado 201007.**

### **3.2. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en la levadura metilotrónica *Pichia pastoris***

En vista de los resultados obtenidos en células de mamíferos, y aún con la finalidad de producir una vacuna de subunidades contra Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus causado por virus Andes, decidimos expresar las regiones expuestas de ambas glicoproteínas en la levadura metilotrónica *Pichia pastoris*. Luego de infructuosos intentos de expresar ambos antígenos recombinantes en un único clon de levadura, decidimos realizar la expresión de ambos antígenos de manera secuencial.

#### **3.2.1. Diseño y expresión de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en *Pichia pastoris***

##### **3.2.1.1. Diseño de la variantes soluble de la glicoproteínas Gn de virus Andes para su expresión en *Pichia pastoris***

Se analizó la secuencia aminoacídica de GPC (UniProtKB ID: Q9E006) de virus Andes cepa Chile-971786 para el diseño de la variantes soluble de la glicoproteína Gn, la cual se denominó Gns . Se emplearon distintos programas bioinformáticos (Department of Bio and Health Informatics, Technical University of Denmark, Dinamarca) para predecir el sitio proteolítico del precursor (ProP 1.0) (Duckert et al., 2004), las regiones transmembranas (TMHMM 2.0) (Sonnhammer et al., 1998), el péptido señal (SignalP 4.0) (Petersen et al., 2011) y los sitios potenciales de N-glicosilación (NetNGlyc 1.0) (Gupta & Brunak, 2002). Se identificaron las regiones expuestas, y se mantuvo intacta esta secuencia. Se añadió la señal de secreción del factor  $\alpha$  de *S. cerevisiae* en el extremo N-terminal y un tag de 7 residuos de histidina en el extremo C-terminal para facilitar su purificación e identificación (Figura R8). El peso molecular teórico de la molécula diseñada corresponde a 44,3 KDa (punto isoeléctrico teórico 6,45).

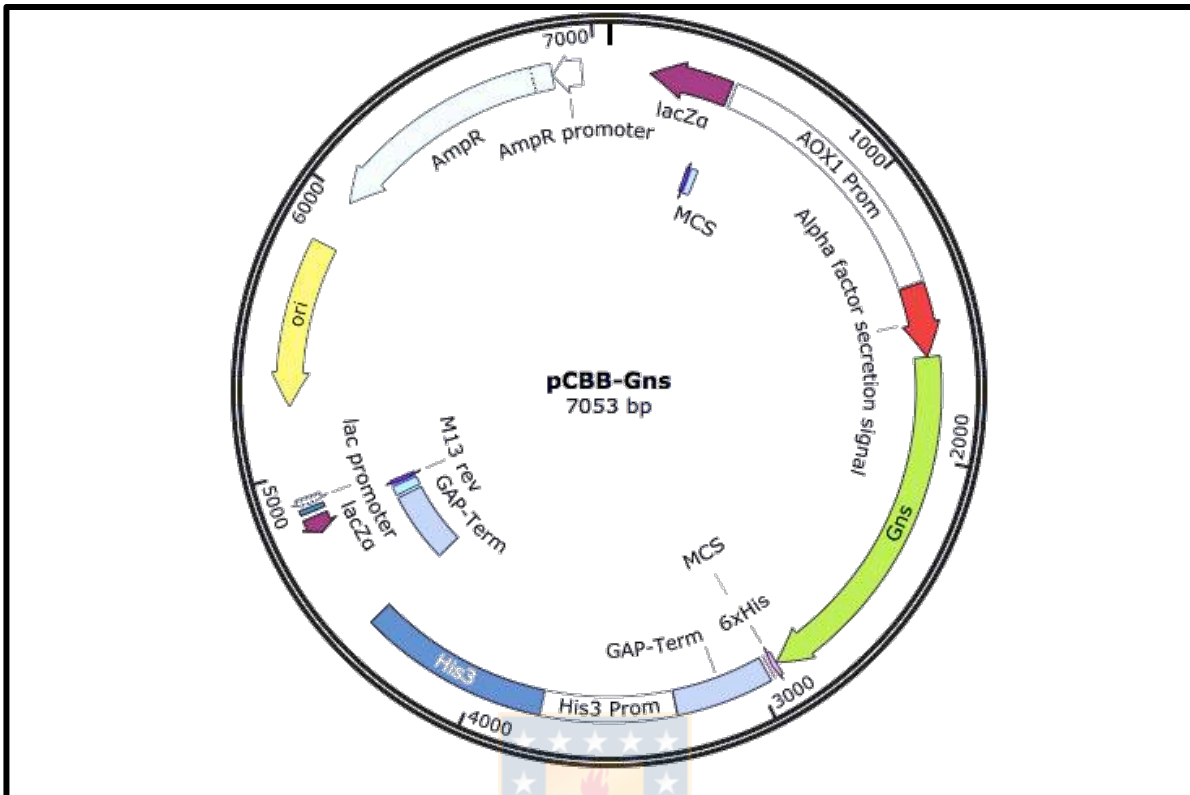
```

MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYSLEGDFDVAVLPFNSNSTNGLLFI
NTTASIAAKEEGVSLEKREAEAEELKMECPHTVGLGQGYIIGSTELGLISIEAASDIKLESSCNFDL
HTTSMAQKSFTQVEWRKKSDDTTTNAASTTFFAQTKTVNLRGTCILAPELYDTLKKVKKTVLC
YDLTCNOTHCQPTVYLIAPVLTCSIRSCMASVFTSRIQVIYEKTHCVTGQLIEGQCFNPAHTLTL
SQPAHTYDVTLPISCFFTPCKSEQLKVIKTFEGILTKTGCTENALQGYVVCFLGSHSEPLIVPSLE
DIRSAEVVSRMLVHPRGEDHDAIQNSQSHLRIVGPITAKVPSTSSDTLKGTAFAAGVPMYSSLSTL
VRNADPEFVFPSPGIVPESNHS TCDKKTVPITWTGYLPISGEMEKVTGCTVFCTLAGPGASCEAYS
ENGIFNTSSPTCLVNLGGGGSGGGGSGGGGSHHHHHHHH*

```

**Figura R8: Secuencia aminoacídica del antígeno recombinante Gns.** En rojo se presenta la señal de secreción de *Alpha Factor*, en verde el tag de histidinas y en lima la secuencia de Gns. En amarillo se resaltan los sitios potenciales de N-glicosilación.

A partir de este diseño, se construyó la secuencia nucleotídica de Gns. Para este diseño, se tuvo en consideración la optimización de codones para la expresión de la molécula recombinante en la levadura metilotrófica *P. pastoris*. El gen diseñado, conteniendo las regiones expuestas de la glicoproteína Gn de virus Andes, la señal de secreción de *Alpha Factor* y una cola de histidina, se insertó dentro del plásmido pCBB-his3, perteneciente a nuestro laboratorio, para su expresión en la levadura *Pichia pastoris* bajo control del promotor de la Alcohol Oxidasa 1 (AOX-1) y selección de los clones recombinantes mediante auxotrofia. La síntesis de este plásmido fue realizado por la empresa GenScript (República Popular China) (Figura R9).



**Figura R9: Constructo para la expresión de Gns en levaduras, pCBB-Gns.** El gen diseñado, conteniendo las regiones expuestas de la glicoproteína Gn de virus Andes, la señal de secreción de *Alpha Factor* y una cola de histidina, se insertó dentro del plásmido pCBB-his3 para su expresión en la levadura *Pichia pastoris* bajo control del promotor de la Alcohol Oxidasa 1 (AOX-1) y selección de los clones recombinantes mediante auxotrofia.



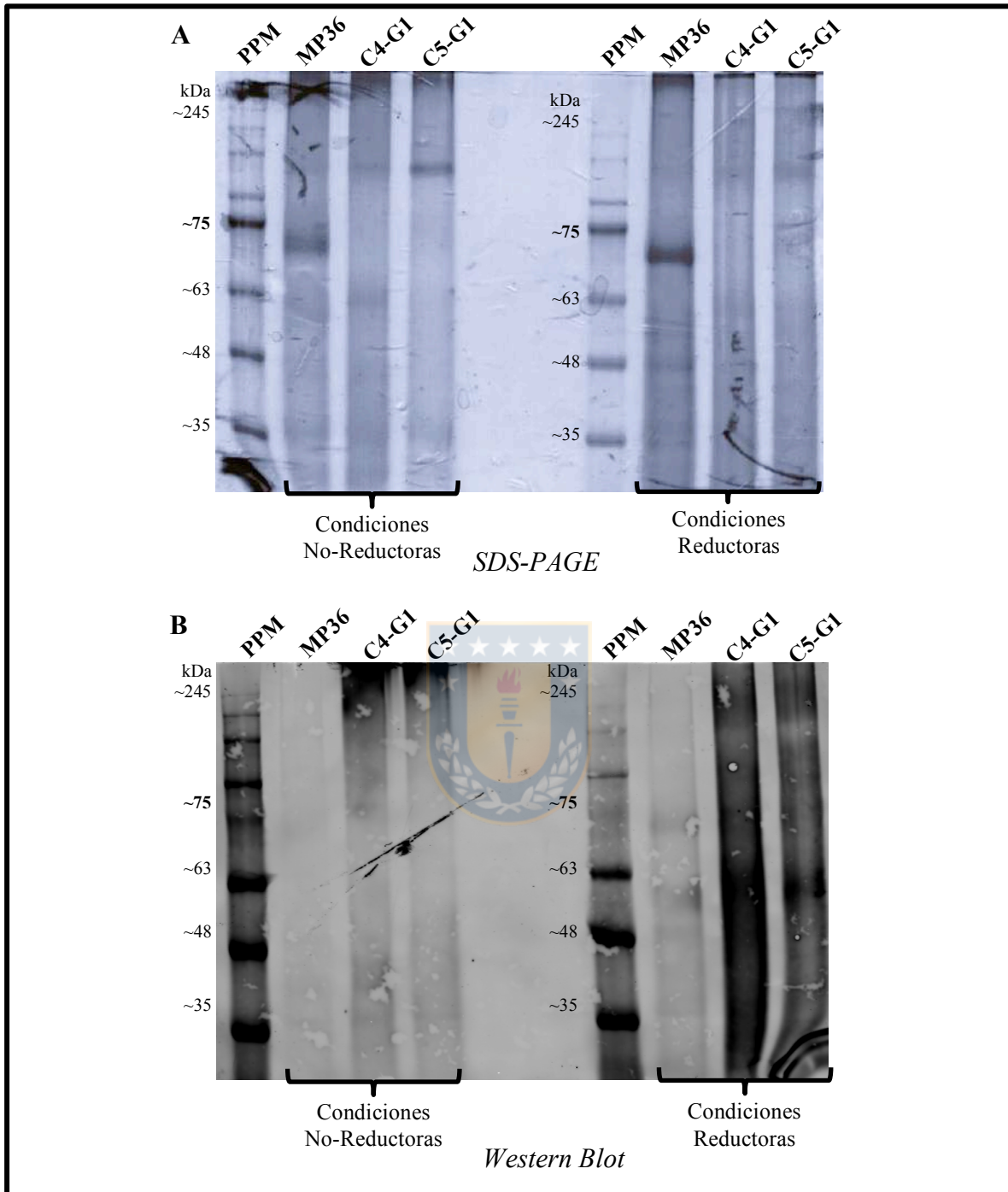
### 3.2.1.2. Expresión de la variantes soluble de la glicoproteínas Gn de virus Andes para su expresión en *Pichia pastoris*

El plásmido diseñado para la expresión del antígeno Gns se utilizó para transformar la cepa MP36 de la levadura *Pichia pastoris*. Los clones recombinantes fueron seleccionados en medio mínimo (YNB *minimal medium*). Se realizó un Dot Blot de ADN de aquellos clones transformados, y se seleccionaron aquellos que dieron señal al utilizar como sonda un fragmento de la secuencia Gn (Figura R10).



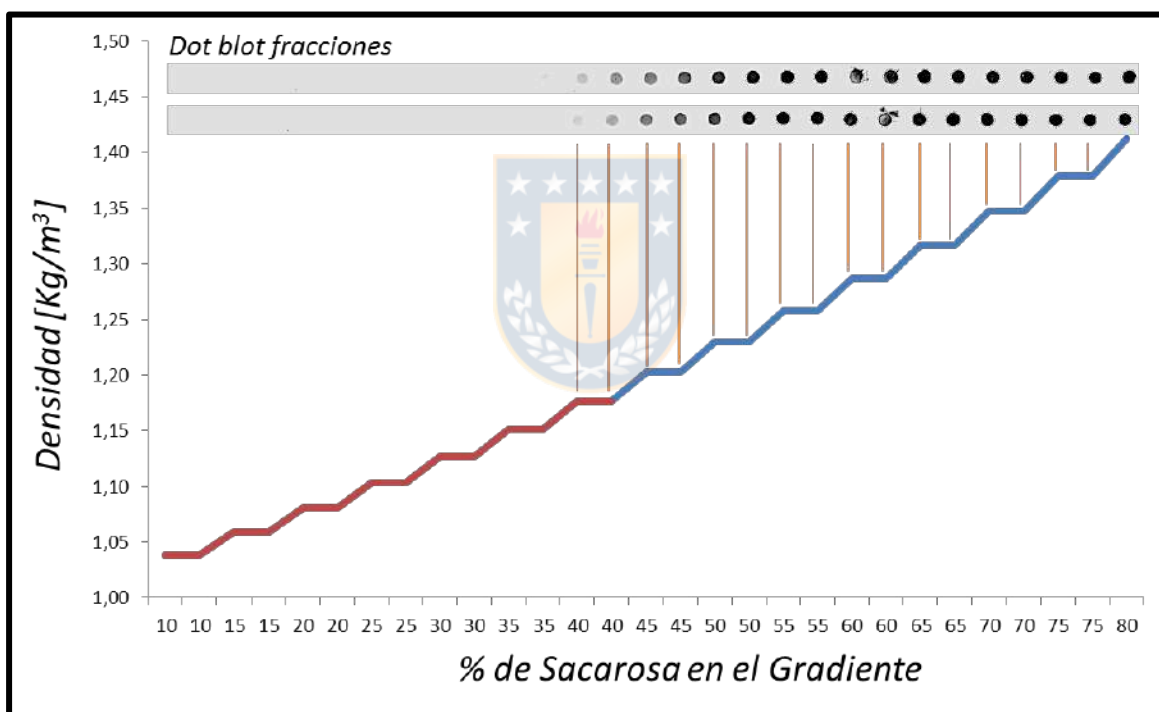
**Figura R10: Dot Blot de ADN de clones de levadura transformados con el plásmido pCBB-Gns. A4:** Clon C4-G1. **B5:** Clon C5-G1. **J1:** Control positivo 5X. **J2.** Control positivo 1X. **J3.** Control positivo 0,2X.

Los clones positivos se denominaron C4-G1 y C5-G1. Se procedió a realizar una inducción a pequeña escala de los clones transformados. Debido a la señal de secreción que se incorporó, y a la ausencia de regiones transmembrana del antígeno diseñado, se esperaba que la proteína se secretara de forma soluble al medio de cultivo. Al finalizar la inducción, se colectó el medio de cultivo y se precipitaron proteínas mediante el método con TCA. Se evaluó la presencia de la proteína recombinante mediante *SDS-PAGE* en condiciones reductoras y no reductoras, seguido por Western Blot utilizando un anticuerpo monoclonal anti-Gn (Figura R11). En estos ensayos, nos fue posible observar que ambos clones son capaces de expresar el antígeno recombinante Gns. Además, observamos que el antígeno forma agregados heterogéneos de distinto peso molecular, algunos de los cuales parecen ser de tamaño superior a 245 kDa.



**Figura R11: SDS-PAGE y Western Blot del sobrenadante de inducción de los clones C4-G1 y C5-G1 en condiciones no reductoras y reductoras. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. B Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-Gn. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. MP36. Sobrenadante de inducción de la cepa nativa MP36. C4-G1. Sobrenadante de inducción del clon C4-G1. C5-G1. Sobrenadante de inducción del clon C5-G1.**

Debido a la heterogeneidad de tamaños del antígeno Gns, observado mediante Western Blot de medio de inducción de *P. pastoris*, decidimos realizar un ensayo de separación por gradiente de densidad. Para ello, utilizamos un gradiente de sacarosa entre 10% y 80%, de forma de determinar la densidad de las distintas fracciones del antígenos Gns, y de ser posible, facilitar la purificación de una fracción determinada. Al terminar la ultracentrifugación, se colectaron las fracciones, que fueron analizadas mediante *Dot Blot* de proteínas, utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gn. Encontramos que el antígeno presenta densidades entre 1,15 y 1,45 Kg/m<sup>3</sup> aproximadamente, distribuyéndose en todo este rango de densidades de forma homogénea. Esto nos lleva a comprobar la formación de agregados de distinto peso molecular y con densidades variables (Figura R12).



**Figura R12: Análisis de densidad de los multímeros encontrados al expresar Gns.** Se grafica la presencia de Gns en las distintas fracciones de un gradiente de sacarosa desde 10% a 80%, determinando la densidad de los multímeros encontrados.

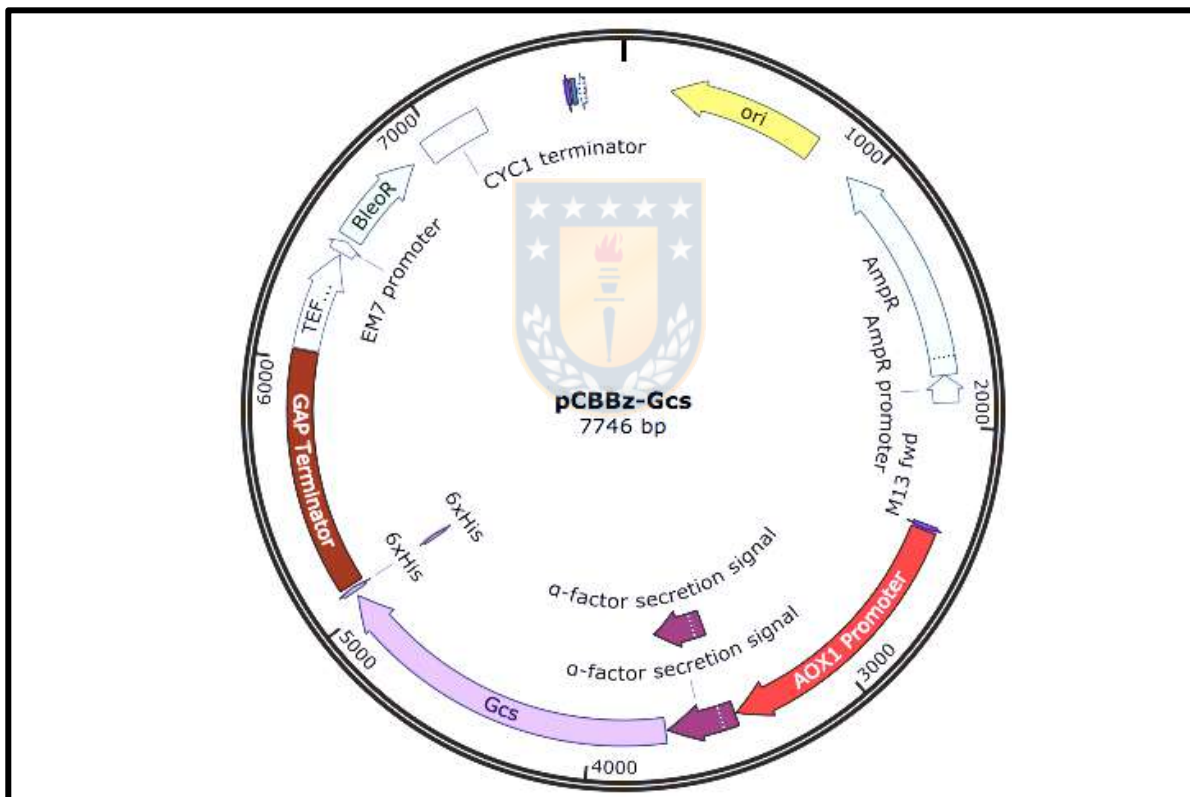
### 3.2.2. Diseño de la variantes soluble de la glicoproteínas Gc de virus Andes para su expresión en *Pichia pastoris*

Debido a la dificultad para purificar un antígeno presente en conformaciones tan heterogéneas, decidimos realizar una nueva transformación del clon C4-G1. Esto, debido a que existe evidencia que demuestra que las glicoproteínas de superficie de los hantavirus forman homo y hetero oligómeros, formando un patrón tipo rejilla en la superficie de los viriones. Además, desde el inicio de nuestro proyecto buscamos obtener antígenos basados en ambas glicoproteínas de superficie de virus Andes. Por esta razón, diseñamos un vector para la expresión de las regiones expuestas de la glicoproteína Gc de virus Andes, antígeno denominado Gcs. Nuevamente se añadió la señal de secreción de Alpha Factor, con el fin de que fuese secretada al medio de cultivo, y una cola de histidinas para facilitar su purificación posterior (Figura R13). El peso molecular teórico de la molécula diseñada corresponde a 51,2 KDa (punto isoeléctrico teórico 6,27).

```
MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDETAQIPAEAVIGYS DLEGDFDVAVL PFSNSTNGLLFI
NTTIA SIAAKEEGVSLEKREAEATPLMESGWSDTAHGVGEIPMKTDLELDFSLPSSSSYSYRRKLT
NPANKEESIPFHFQMEKQVIHAEIQPLGHWMDATFNIKTA FH CYGACQKYSYPWQTSKCFEFD
YQYETGWGCNPGDCPGVGTGCTACGVYLDK LKSVGKAYKIISLKYTRKVCIQLGTEQTCKHID
ANDCLVTPSVKVCIVGTVSKLQPSDTLLFLGPLEQGGI LKQWCTTSCAFGDPGDIMSTPSGMRC
PEHTGSFRKICGFATTPVCEYQGNTISGYKRMMATKDSFQSF NLT EPHITTNKLEWIDPDGNTRD
HVNVLVLRDVSFQDLSDNPCKVDLHTQAIEGAWGSGVGF TLCTVGLTECPSFMTSIKACDLAM
CYGSTVTNLARGSN TVKVVGKGGHSGSSFKCCHDTDCSSEGLLASAPHLERVTGFNQIDSDKVY
DDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGGGGSGGGSGGGGS HHHHHHH*
```

**Figura R13: Secuencia aminoacídica del antígeno recombinante Gcs.** En rojo se presenta la señal de secreción de *Alpha Factor*, en verde el tag de histidinas y en morado la secuencia de Gcs. En amarillo se resalta el sitio potencial de N-glicosilación.

A partir de este diseño, se construyó la secuencia nucleotídica de Gns. Para este diseño, se tuvo en consideración la optimización de codones para la expresión de la molécula recombinante en la levadura metilotrófica *P. pastoris*. El gen diseñado fue clonado en el vector de expresión en *Pichia pastoris* pCBBz bajo control del promotor AOX-1. El plásmido pCBBz es una variación del plásmido pCBB-his3, construido en nuestro laboratorio, en el que se reemplazó el gen His3, que codifica para la enzima lmidazolglicerol-fosfato deshidratasa, necesaria para la biosíntesis de histidina, por el gen Sh ble, que otorga resistencia a Bleomicina, y permite la selección de clones recombinantes utilizando Zeocina. El plásmido resultante se denominó pCBBz-Gcs, y su síntesis fue también realizada por la empresa GenScript (República Popular China) (Figura R14).

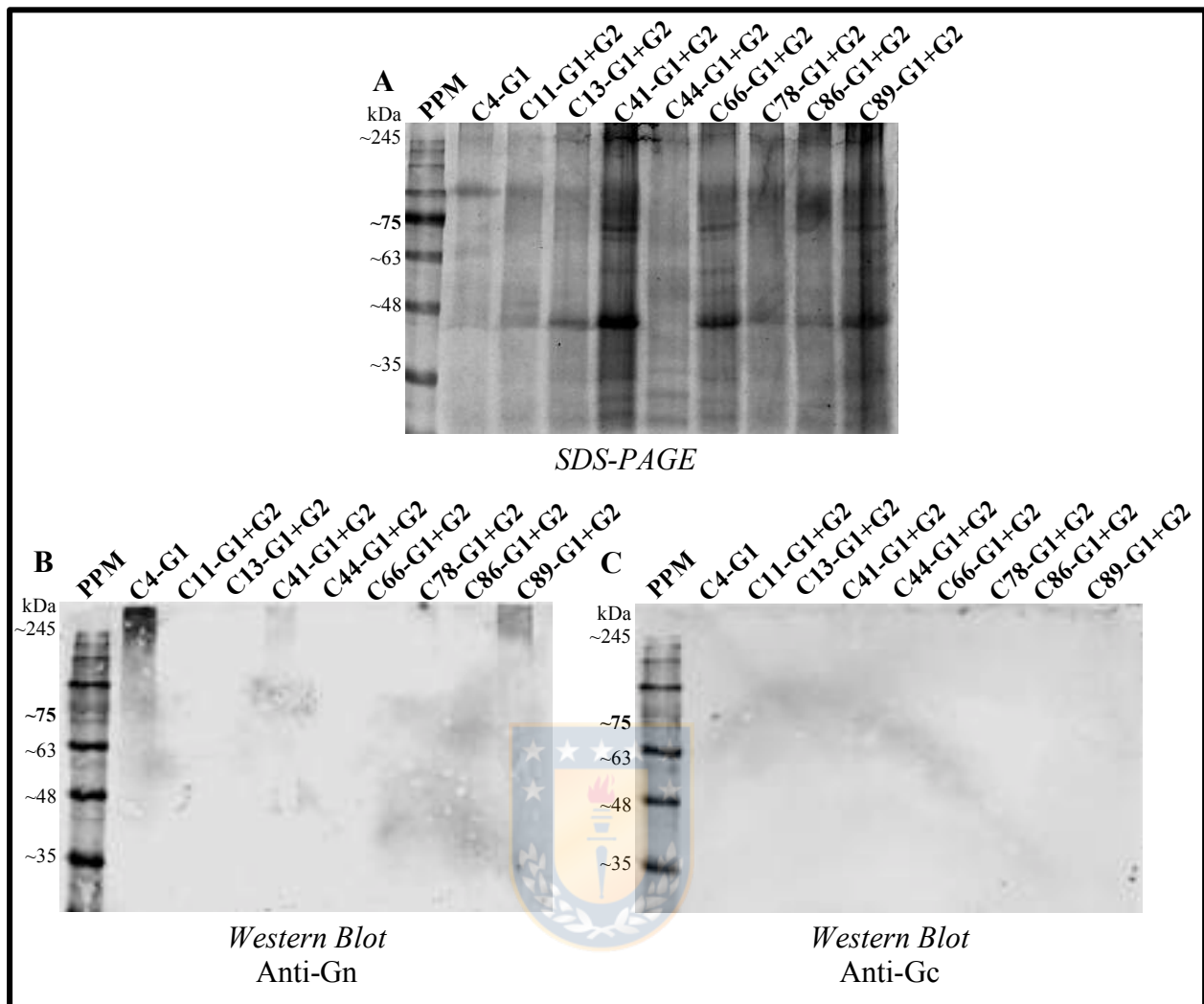


**Figura R14: Constructo para la expresión de Gcs en levaduras, pCBBz-Gcs.** El gen diseñado, conteniendo las regiones expuestas de la glicoproteína Gc de virus Andes, la señal de secreción de *Alpha Factor* y una cola de histidina, se insertó dentro del plásmido pCBBz para su expresión en la levadura *Pichia pastoris* bajo control del promotor de la Alcohol Oxidasa 1 (AOX-1) y selección de los clones recombinantes mediante zeocina.

### **3.2.3. Co-expresión de la variantes soluble de la glicoproteínas Gc de virus Andes para su expresión en el clon C4-G1 de *Pichia pastoris***

El clon C4-G1 fue re-transformado utilizando el plásmido anteriormente descrito para la expresión de los dominios expuestos de Gc. Los clones recombinantes fueron seleccionados mediante crecimiento en medio sólido con Zeocina (YP-glucosa-Zeo). Posteriormente, los clones fueron crecidos en medio líquido manteniendo la presión selectiva. Aquellos clones recombinantes capaces de crecer en medio con Zeocina fueron inducidos a pequeña escala. Posterior a la inducción con metanol, se evaluó la presencia de ambos antígenos en el medio de inducción. Se precipitaron las proteínas mediante el método con TCA y se realizó *SDS-PAGE* en condiciones reductoras, seguido de ensayos de *Western Blot* utilizando anticuerpos monoclonales anti-Gn y anti-Gc (Figura R15).

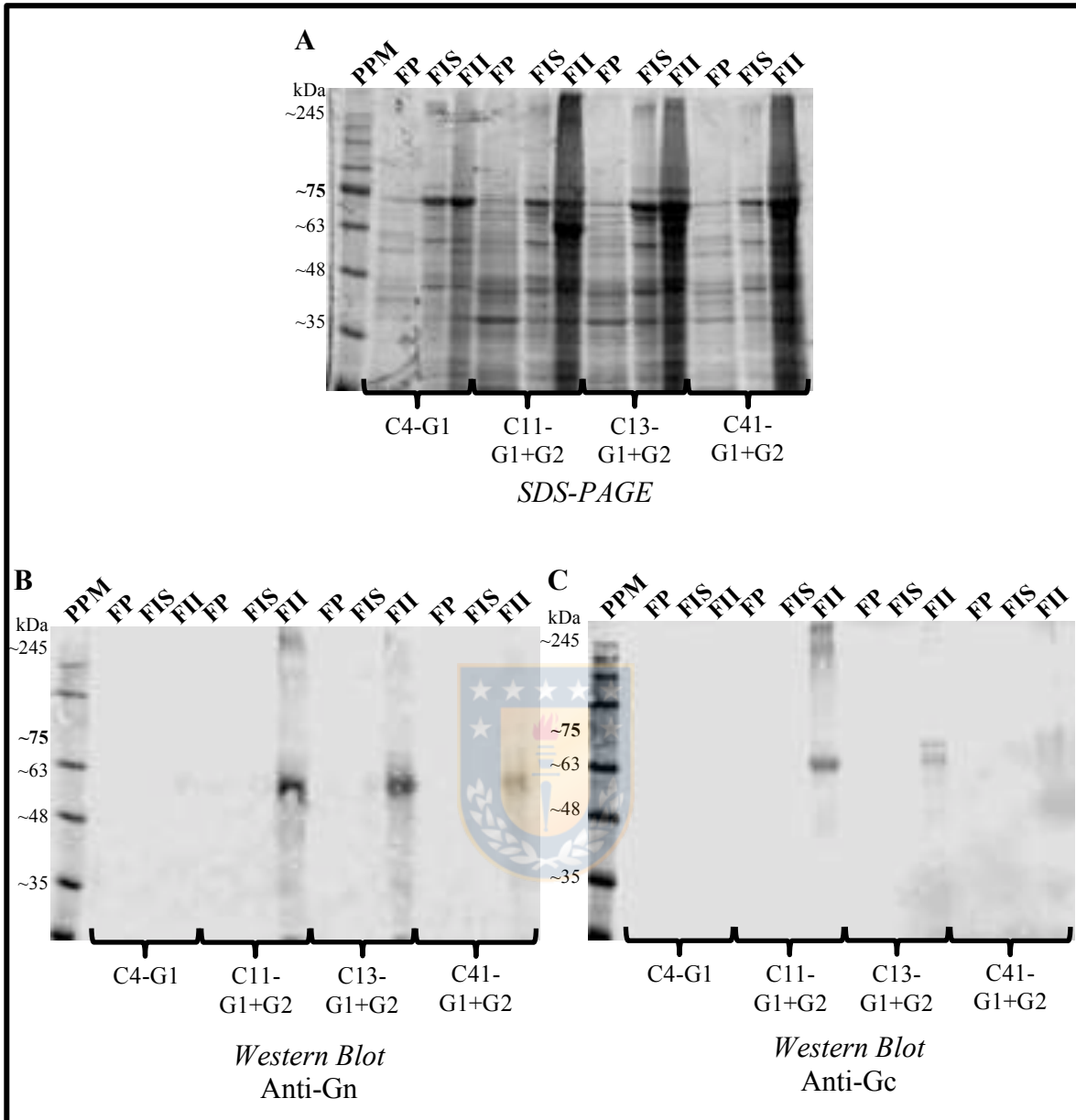




**Figura R15: SDS-PAGE y Western Blot del sobrenadante de inducción de los clones obtenidos por re-transformación de C4-G1 con pCBBz-Gcs. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. B. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-Gn. C. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-Gc. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. C4-G1. Sobrenadante de inducción del clon C4-G1. C11-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C11-G1+G2. C13-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C13-G1+G2. C41-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C41-G1+G2. C44-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C44-G1+G2. C66-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C66-G1+G2. C78-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C78-G1+G2. C86-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C86-G1+G2. C89-G1+G2. Sobrenadante de inducción del clon C89-G1+G2.**

Los clones recombinantes, obtenidos por la re-transformación del C4-G1 (que expresa Gns en el medio de inducción), no fueron capaces de expresar en el medio de inducción al antígeno recombinante Gcs. Sin embargo, notamos que muchos de los clones doblemente recombinantes (clones C11, C13, C44, C66, C78 y C86) además habían dejado de secretar al medio de cultivo el antígeno recombinante Gns. En vista de esto, estimamos la posibilidad de que la ausencia de ambas glicoproteínas en el medio de inducción pudiera deberse a la expresión de Gcs al interior de la levadura, y que ésta estuviese provocando también la retención del antígeno Gns. Decidimos realizar la ruptura del pellet de levaduras obtenido de la inducción del clon inicial C4-G1 y de los clones doblemente recombinantes C11-G1+G2, C13-G1+G2 y C41-G1+G2. Se separaron y analizaron las fracciones periplasma, intracelular soluble e intracelular insoluble de cada clon (Figura R16). Con este ensayo, se comprobó que efectivamente los clones doblemente recombinantes son capaces de expresar ambos antígenos basados en las glicoproteínas de superficie de virus Andes. Sin embargo, ambas proteínas recombinantes quedan retenidas al interior de las levaduras. En base a lo observado, decidimos continuar trabajando con el clon C11-G1+G2, ya que parece ser el que expresa en mayor cantidad ambos antígenos. Esto de acuerdo a lo observado por la banda reforzada que se presenta en el gel de poliacrilamida teñido con azul de Coomassie (Fig. R16A, carril 7), que coincide con las señales observada en los ensayos de *Western Blot* (Fig. R16B y R16C, carril 7).

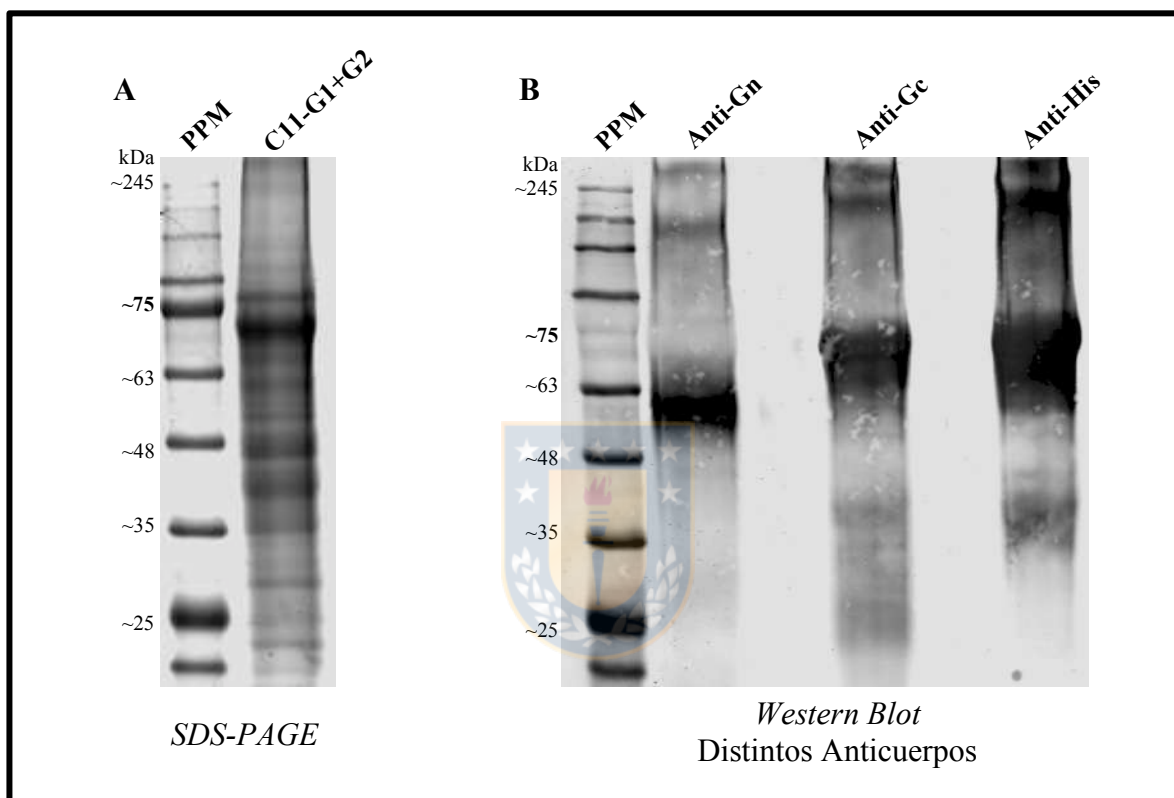




**Figura R16: SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones intracelulares de los clones obtenidos por re-transformación de C4-G1 con pCBBz-Gcs, posterior a su inducción. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie. B. Western Blot utilizando anticuerpo anti-Gn. C. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-Gc. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. FP. Fracción periplasmática de ruptura de levaduras FIS. Fracción intracelular soluble de ruptura de levaduras. FII. Fracción intracelular insoluble de ruptura de levaduras. C4-G1. Fracciones de ruptura de C4-G1. C11-G1+G2. Fracciones de ruptura de C11-G1+G2. C13-G1+G2. Fracciones de ruptura de C13-G1+G2. C41-G1+G2. Fracciones de ruptura de C41-G1+G2.**

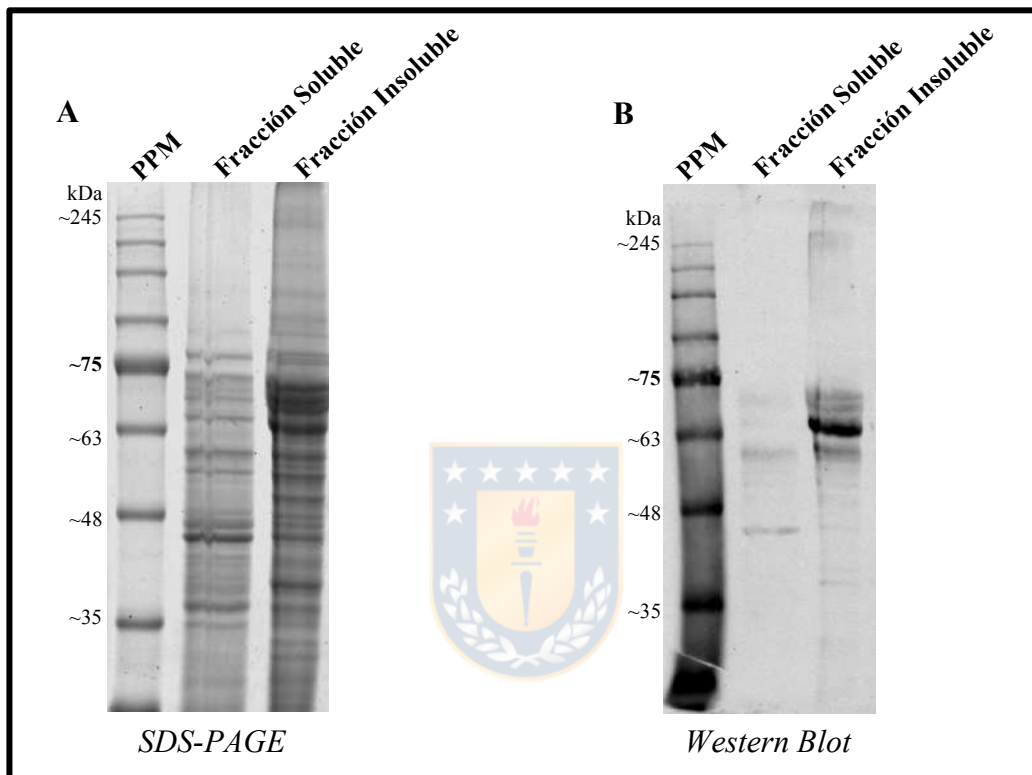
### 3.2.4. Producción, solubilización, purificación, replegamiento y caracterización de los antígenos recombinantes Gns y Gcs

Se realizó la inducción del clon C11-G1+G2 en un fermentador de escala piloto (10 L). Posteriormente, se analizó la expresión de ambos antígenos en el pellet de fermentación obtenido empleando anticuerpos monoclonales específicos contra cada una de las glicoproteínas de superficie de virus Andes (Figura R17).



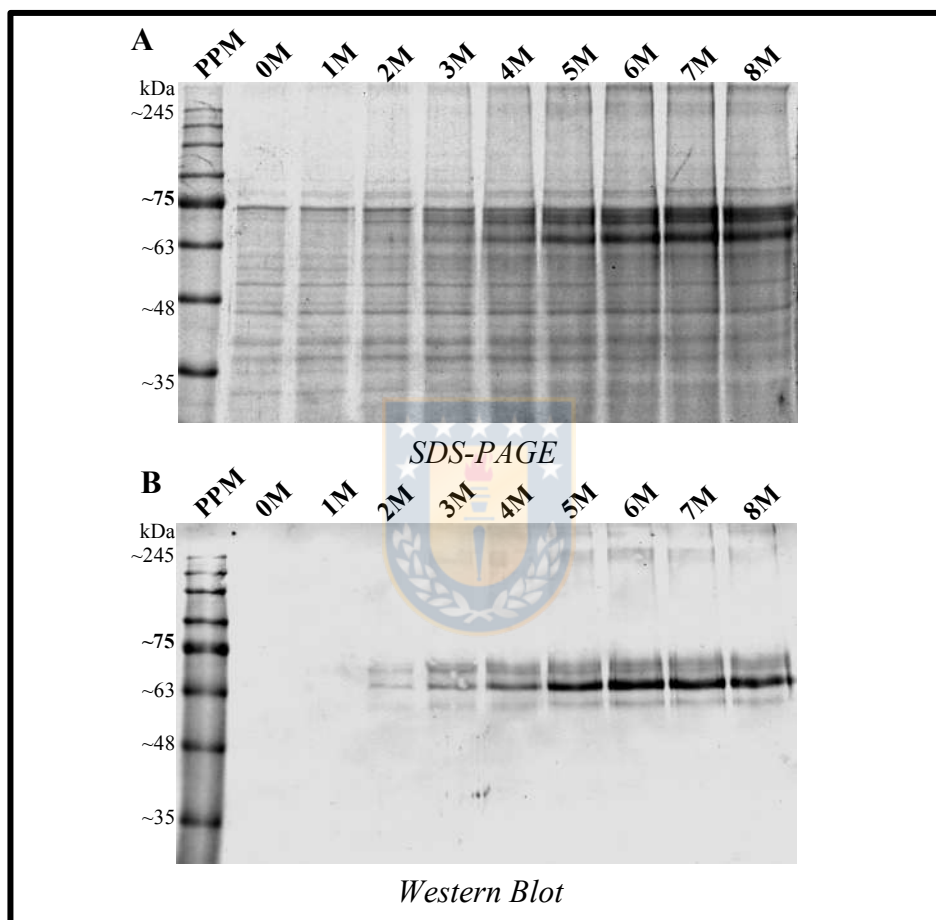
**Figura R17: SDS-PAGE y Western Blot de la fracción soluble de la ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2.** A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. B. Western Blot utilizando distintos anticuerpos primarios. **PPM.** Patrón de peso molecular de proteínas. **C11-G1+G2.** Precipitado de fermentación del clon C11-G1+G2. **Anti-Gn.** Precipitado de fermentación del clon C11-G1+G2, utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gn. **Anti-Gc.** Precipitado de fermentación del clon C11-G1+G2, utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gc. **Anti-His.** Precipitado de fermentación del clon C11-G1+G2, utilizando anticuerpo monoclonal anti-poli-His.

Empleando el pellet de fermentación, se estandarizaron las condiciones de ruptura y solubilización de los antígenos recombinantes. Estos ensayos nos llevaron a establecer como buffer de ruptura PBS + PMSF 0,1 mM, pH 7,4. Analizamos la presencia de los antígenos en las fracciones solubles e insolubles de ruptura mediante *SDS-PAGE* 10% y *Western Blot* en condiciones reductoras (Figura R18).

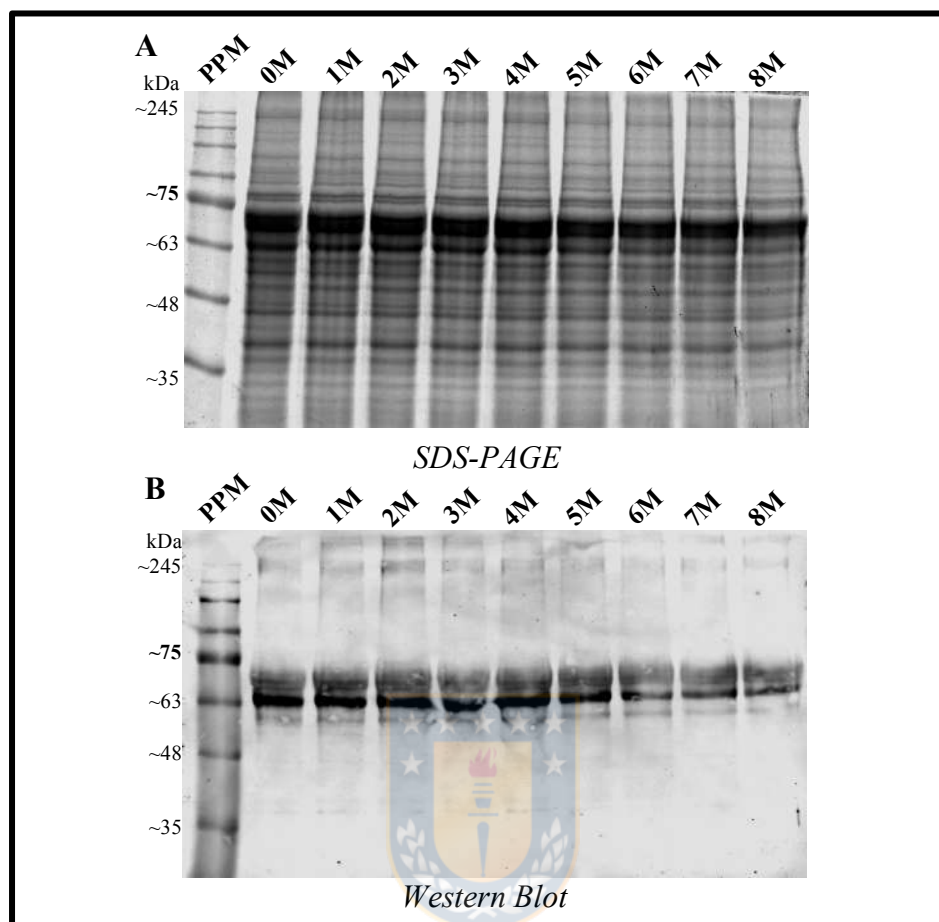


**Figura R18: *SDS-PAGE* y *Western Blot* de las fracciones soluble e insoluble luego de la ruptura del precipitado de fermentación del clon C11-G1+G2. A. *SDS-PAGE* 10% teñido con azul de Coomasie, condiciones reductoras. B. *Western Blot* utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. Fracción Soluble. Fracción soluble de ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2. Fracción Insoluble. Fracción insoluble de ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2.**

Para solubilizar ambos antígenos, necesario para su posterior purificación, se realizó un gradiente de urea como primera aproximación. Para ello, la fracción insoluble obtenida de la ruptura del precipitado de fermentación fue resuspendida en tampón fosfato pH 7,0 conteniendo distintas concentraciones de urea, desde 0 a 8M. Se analizaron las fracciones solubles (Figura R19) e insolubles (Figura R20) de solubilización mediante *SDS-PAGE* 10% y *Western Blot* en condiciones reductoras.

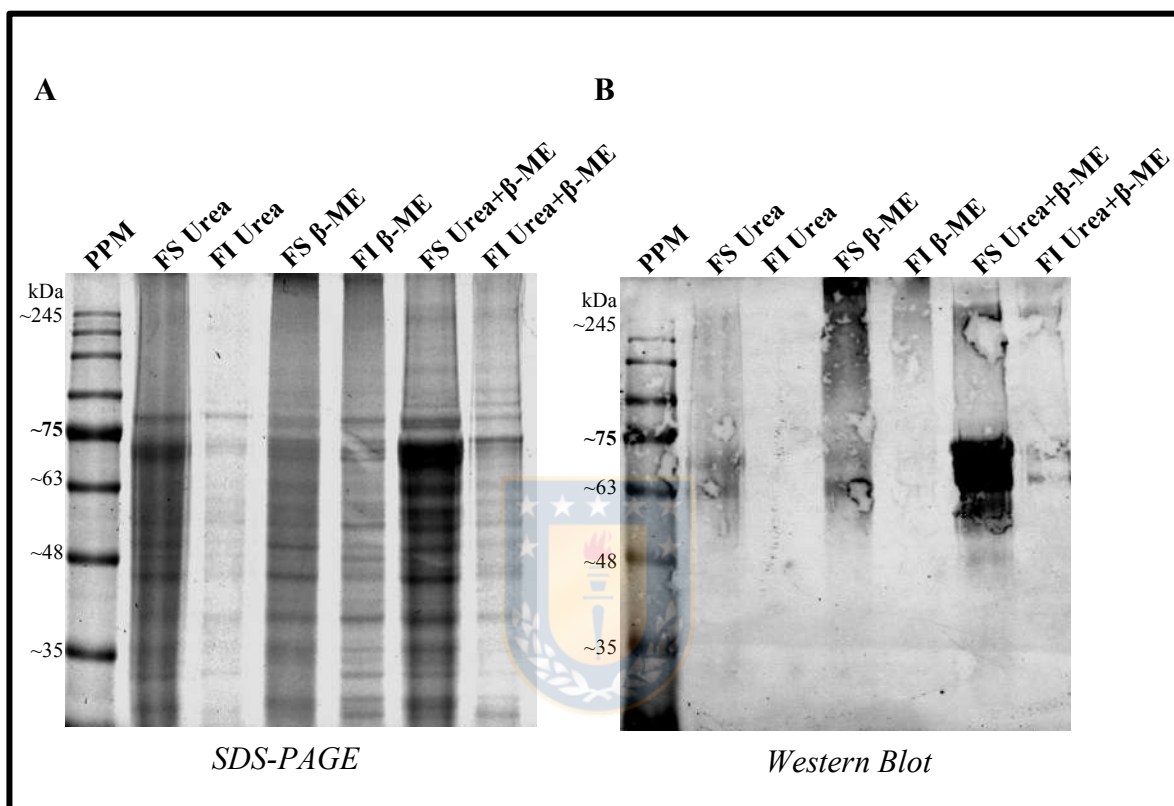


**Figura R19: *SDS-PAGE* y *Western Blot* de las fracciones solubles luego de la solubilización en urea de la fracción insoluble de ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2. A. *SDS-PAGE* 10% teñido con azul de Coomassie de las fracciones solubles, condiciones reductoras. B. *Western Blot* utilizando anticuerpo primario anti-poli-His de las fracciones solubles, condiciones reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. 0M. Solubilización en urea 0 M. 1M. Solubilización en urea 1 M. 2M. Solubilización en urea 2 M. 3M. Solubilización en urea 3 M. 4M. Solubilización en urea 4 M. 5M. Solubilización en urea 5 M. 6M. Solubilización en urea 6 M. 7M. Solubilización en urea 7 M. 8M. Solubilización en urea 8 M.**

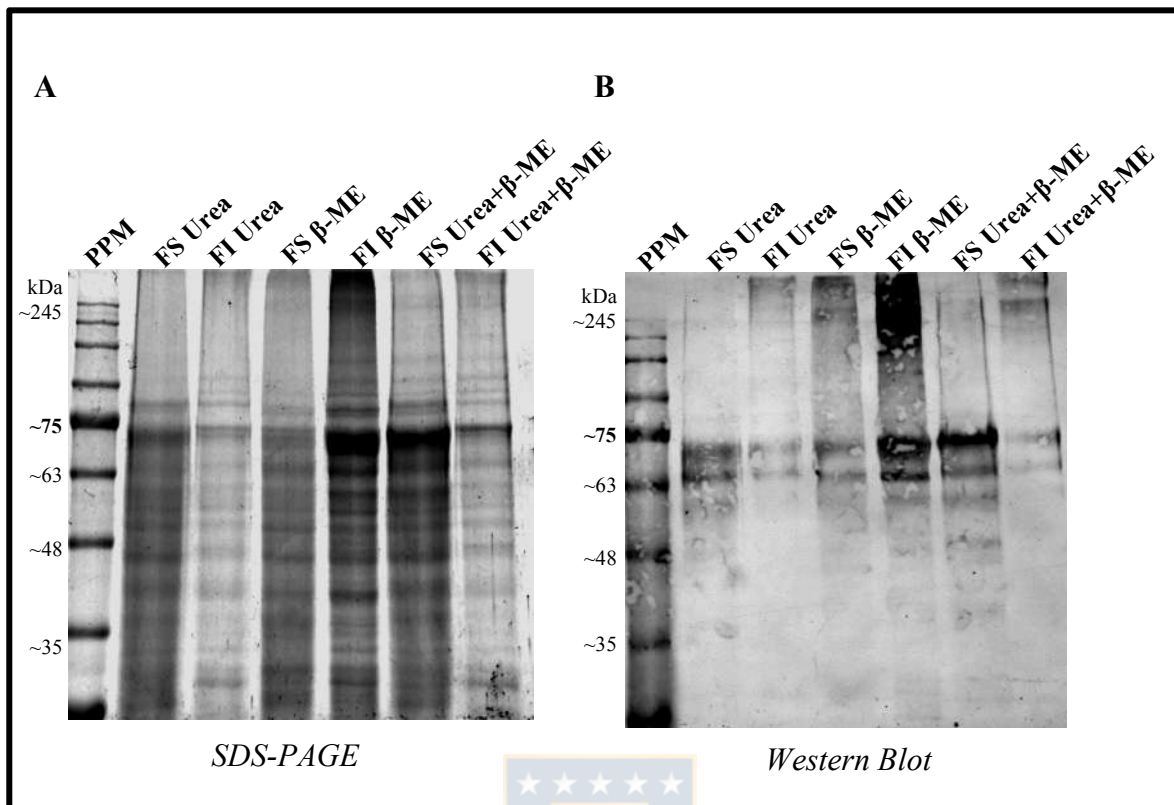


**Figura R20: SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones insolubles luego de la solubilización en urea de la fracción insoluble de ruptura del pellet de fermentación del clon C11-G1+G2. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie de las fracciones insolubles, condiciones reductoras. B. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-poli-His de las fracciones insolubles, condiciones reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. 0M. Solubilización en urea 0 M. 1M. Solubilización en urea 1 M. 2M. Solubilización en urea 2 M. 3M. Solubilización en urea 3 M. 4M. Solubilización en urea 4 M. 5M. Solubilización en urea 5 M. 6M. Solubilización en urea 6 M. 7M. Solubilización en urea 7 M. 8M. Solubilización en urea 8 M**

Del ensayo de solubilización, se decidió emplear urea a una concentración de 8M. Para mejorar estas condiciones, se analizaron distintas condiciones de solubilización modificando el pH y añadiendo  $\beta$ -mercaptoetanol como agente reductor. Se compararon las condiciones mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot* en condiciones no reductoras (Figura R21) y reductoras (Figura R22).



**Figura R21: *SDS-PAGE* y *Western Blot* de las fracciones soluble e insoluble de solubilización en condiciones no reductoras. A. *SDS-PAGE* 10% teñido con azul de Coomasie, condiciones no reductoras. B. *Western Blot* utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones no reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. FS Urea. Fracción soluble en urea 8 M. FI Urea. Fracción insoluble en Urea 8 M. FS  $\beta$ -ME. Fracción soluble en  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. FI  $\beta$ -ME. Fracción insoluble en  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. FS Urea+ $\beta$ -ME. Fracción soluble en urea 8 M +  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. FI Urea+ $\beta$ -ME. Fracción insoluble en urea 8 M +  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM.**

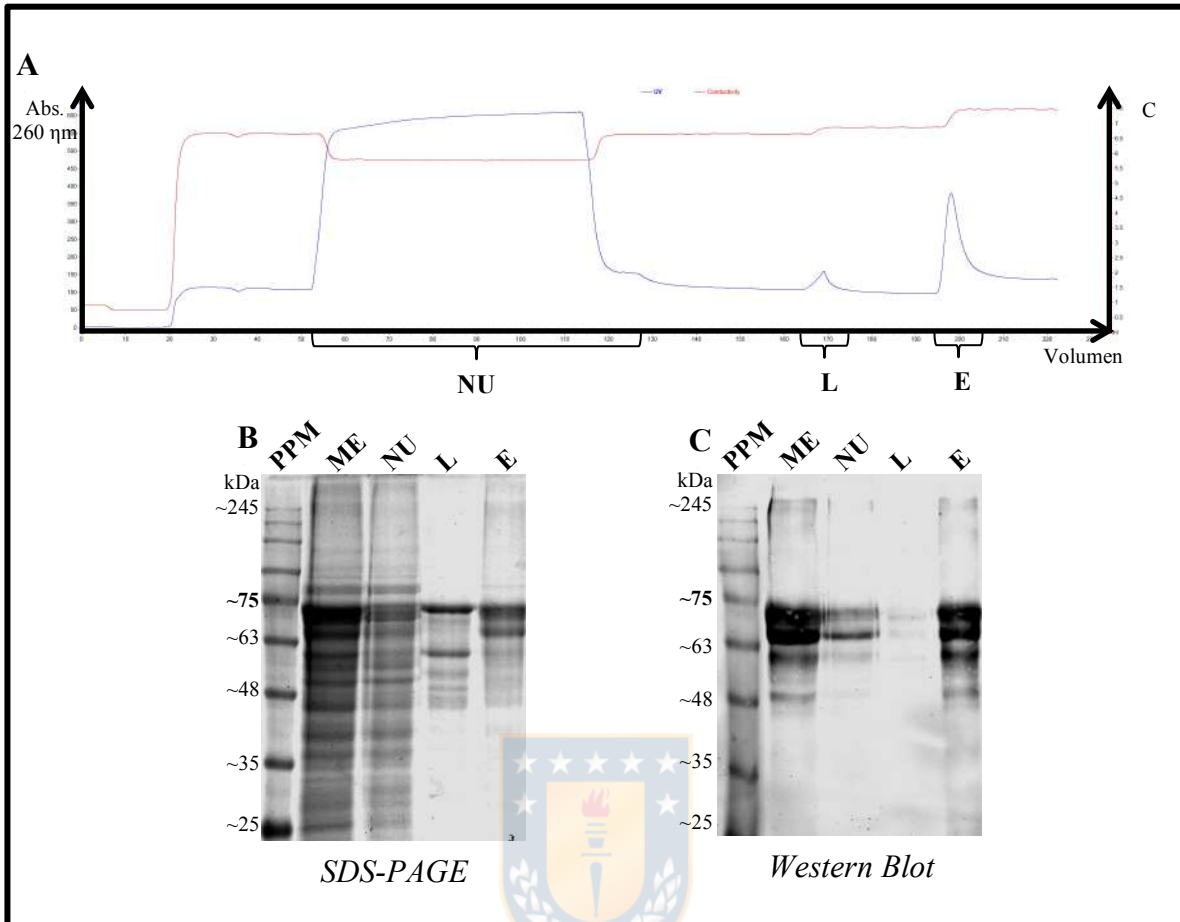


**Figura R22: SDS-PAGE y Western Blot de las fracciones soluble e insoluble de solubilización en condiciones reductoras. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. B. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones reductoras. PPM.** Patrón de peso molecular de proteínas. **FS Urea.** Fracción soluble en urea 8 M. **FI Urea.** Fracción insoluble en Urea 8 M. **FS β-ME.** Fracción soluble en β-mercaptoetanol 10 mM. **FI β-ME.** Fracción insoluble en β-mercaptoetanol 10 mM. **FS Urea+β-ME.** Fracción soluble en urea 8 M + β-mercaptoetanol 10 mM. **FI Urea+β-ME.** Fracción insoluble en urea 8 M + β-mercaptoetanol 10 mM.

De los ensayos de solubilización, se estableció el empleo de buffer conteniendo urea 8 M y  $\beta$ -mercaptoetanol 10 mM. Con los antígenos ya solubilizados, se procedimos a establecer un protocolo de purificación mediante cromatografía de afinidad a quelatos metálicos (IMAC). Se empleó el equipo Äkta Start® para realizar la purificación, empleando una columna conteniendo la matriz Chelating Sepharose Fast Flow® cargada con níquel. Realizamos un gradiente escalonado con concentraciones crecientes de imidazol (0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM de Imidazol). Finalmente, se realizó la descarga de la matriz empleando EDTA 200 mM. Se analizaron cada una de las fracciones colectadas mediante *SDS-PAGE* y Western-Blot. De este ensayo de purificación, se decidió emplear concentraciones de 5mM de imidazol para a entrada de la muestra a la columna, 50 mM de imidazol para el lavado y 200 mM de imidazol para la elución de los antígenos recombinantes. Nuevamente, se mantuvo durante todo el proceso urea y  $\beta$ -mercaptoetanol en cada uno de los buffers empleados. Para la purificación se empleó nuevamente el equipo Äkta Start® y una columna conteniendo la matriz Chelating Sepharose Fast Flow® cargada con níquel. Se analizaron las fracciones obtenidas mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot* (Figura R23).







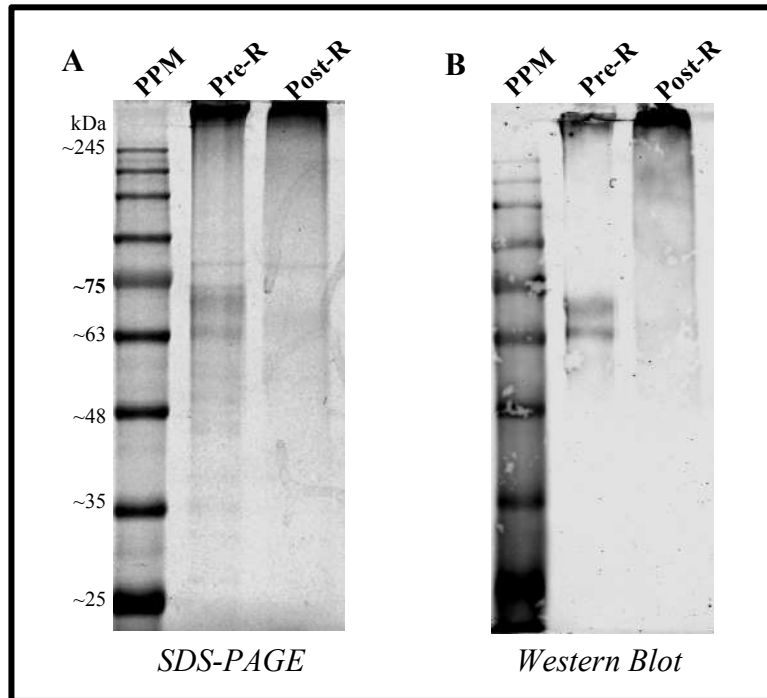
**Figura R23: Purificación de los antígenos recombinantes Gns y Gcs solubilizados.**

**A.** Cromatograma del proceso de purificación mediante IMAC, indicando la absorbancia a 260 nm en azul y la conductividad en rojo. **B.** SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. **C.** Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones reductoras. **PPM.** Patrón de peso molecular de proteínas. **ME.** Fracción solubilizada conteniendo los antígenos Gns y Gcs (Muestra de entrada). **NU.** Fracción No-Unida. **L.** Fracción Lavada. **E.** Fracción Eluída.

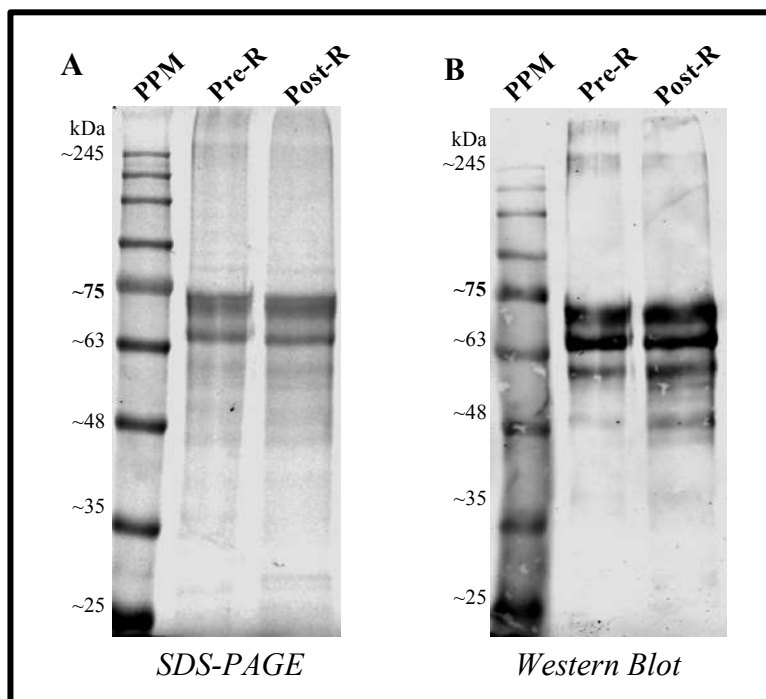
Análisis densitométricos de *SDS-PAGE* teñidos con azul de Coomassie de la fracción purificada, analizados con el software ImageJ (Schneider et al., 2012), indican la obtención del antígeno recombinante con un 98% de pureza. El rendimiento del proceso de obtención de los antígenos recombinantes sería de alrededor de 2 gramos de antígeno por litro de fermentación (2 g/L).

Posterior a la purificación, decidimos realizar el proceso de replegamiento de las proteínas. Se empleó la fracción de elución obtenida del proceso de purificación mediante IMAC previamente descrito. El procedimiento de replegamiento fue realizado mediante cambio de buffer por goteo y concentración por diafiltración empleando una membrana de ultrafiltración de 5 KDa Merck Millipore (Alemania). El estado de las proteínas previa y posteriormente al proceso de replegamiento fue analizado mediante *SDS-PAGE* y Western Blot en condiciones no reductoras (Figura R24) y reductoras (Figura R25). Al analizar los antígenos posterior al proceso de replegamiento, es posible observar que se encuentran formando agregados de alto peso molecular, por sobre los 245 KDa. Es posible que parte de estos agregados de alto peso molecular no sean capaces de ingresar al gel separador, quedando retenidos en el gel concentrador al realizar la electroforesis.



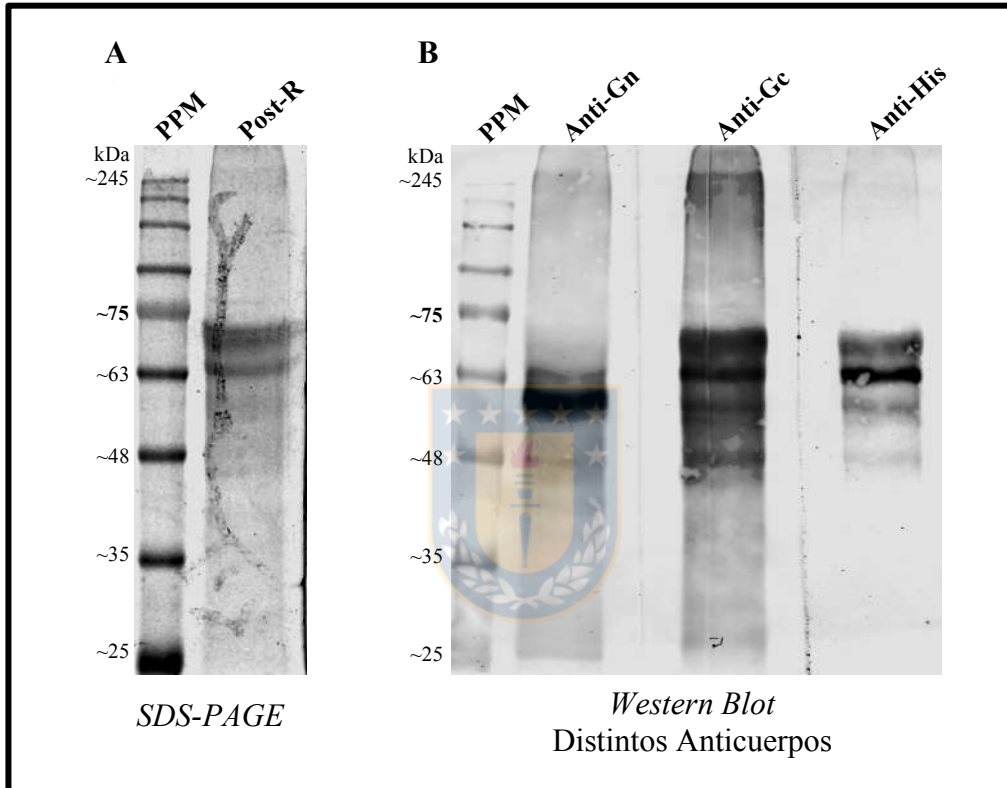


**Figura R24: SDS-PAGE y Western Blot en condiciones no reductoras de los antígenos recombinantes previa y posteriormente al proceso de replegamiento. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie, condiciones no reductoras. B. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones no reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. Pre-R. Muestra pre-replegamiento (Fracción elución IMAC). Post-R. Muestra post-replegamiento.**



**Figura R25: SDS-PAGE y Western Blot en condiciones reductoras de los antígenos recombinantes previa y posteriormente al proceso de replegamiento. A. SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomasie, condiciones reductoras. B. Western Blot utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. Pre-R. Muestra pre-replegamiento (Fracción elución IMAC). Post-R. Muestra post-replegamiento.**

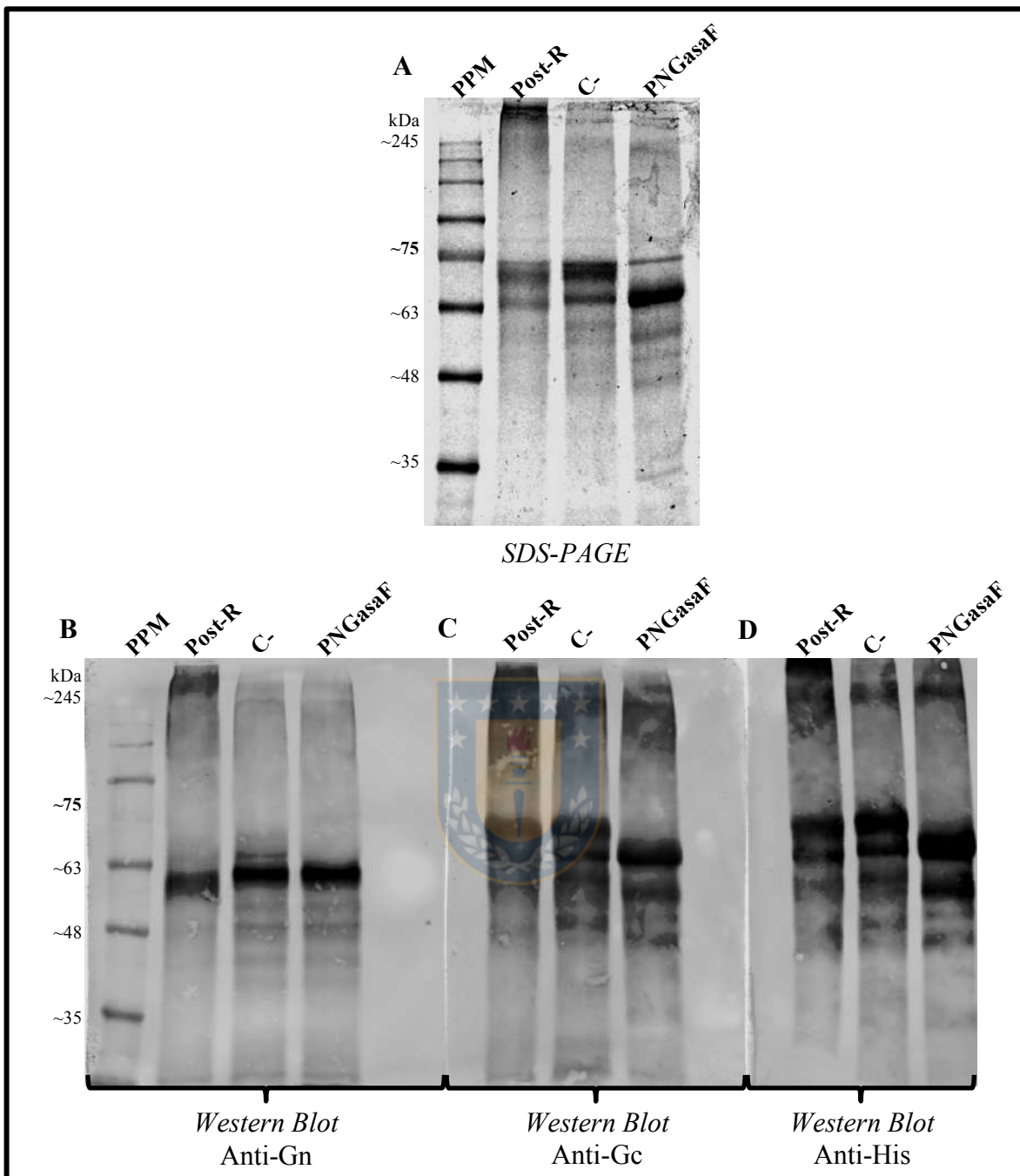
Para caracterizar más en profundidad los antígenos recombinantes, decidimos analizar la muestra post-replegamiento mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot* empleando anticuerpos específicos contra las glicoproteínas de virus Andes Gn y Gc (Figura R26). Mediante el ensayo de *Western Blot* empleando anticuerpos específicos contra las glicoproteínas de virus Andes, pudimos comprobar la presencia de ambos antígenos posterior a los procesos de purificación y replegamiento (Figura R26-C).



**Figura R26: *SDS-PAGE* y *Western Blot* de los antígenos recombinantes post-replegamiento.** **A.** *SDS-PAGE* 10% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. **B.** *Western Blot* utilizando distintos anticuerpos primarios, condiciones reductoras. **PPM.** Patrón de peso molecular de proteínas. **Post-R.** Muestra post-replegamiento. **Anti-Gn.** Muestra post-replegamiento, utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gn. **Anti-Gc.** Muestra post-replegamiento, utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gc. **Anti-His.** Muestra post-replegamiento, utilizando anticuerpo monoclonal anti-poli-His.

Para determinar la ocupación de los potenciales sitios de N-glicosilación presentes en ambos antígenos (4 potenciales sitios de N-glicosilación en el antígeno basado en Gn y 1 potencial sitio de N-glicosilación en el antígeno basado en Gc), realizamos un ensayo de des-glicosilación empleando PNGasa-F. Los productos de este ensayo fueron analizados mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot* utilizando anticuerpos específicos contra las glicoproteínas de virus Andes Gn y Gc. Según lo observado, parece ser que el antígeno recombinante basado en la glicoproteína Gc presenta ocupado su potencial sitio de N-glicosilación. En tanto, el antígeno recombinante basado en la glicoproteína Gn no parece tener ocupado ninguno de sus cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (Figura R27).





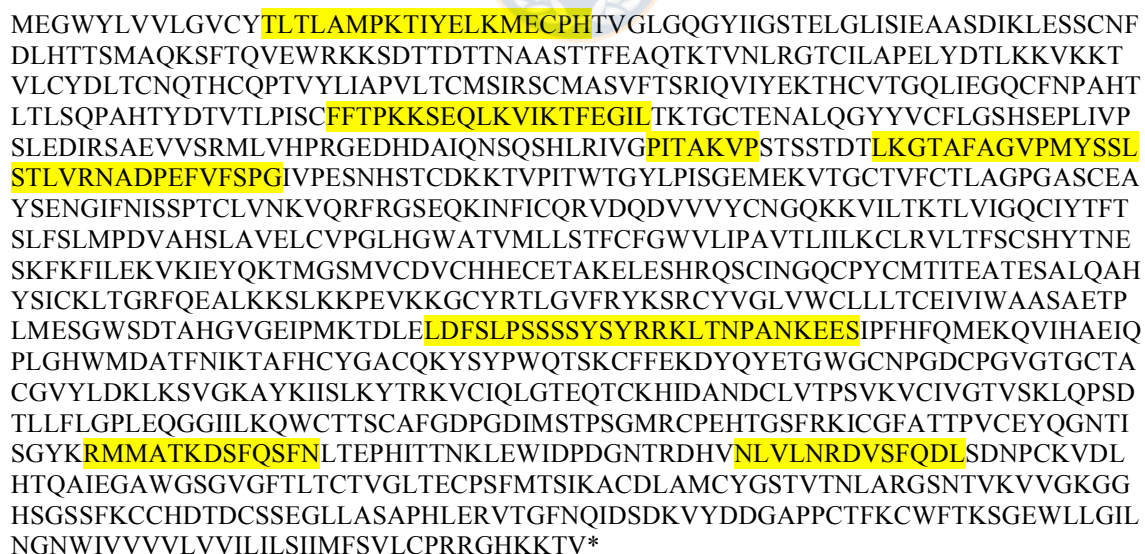
**Figura R27: Análisis de ocupación de sitios potenciales de N-Glicosilación en los antígenos recombinantes.** **A.** *SDS-PAGE* 10% teñido con azul de Coomasie, condiciones reductoras. **B.** *Western Blot* utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gn, condiciones reductoras. **C.** *Western Blot* utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gc, condiciones reductoras. **D.** *Western Blot* utilizando anticuerpo monoclonal anti-poli-His, condiciones reductoras. **PPM.** Patrón de peso molecular de proteínas. **Post-R.** Muestra post-replegamiento. **C-.** Muestra sin tratamiento con PNGasa-F. **PNGasaF.** Muestra tratada con PNGasa-F.

### 3.3. Diseño, expresión y purificación de un antígeno recombinante multiepitópico basado en las proteínas de virus Andes

En paralelo al trabajo desarrollado para la obtención de los antígenos recombinantes Gns y Gcs desde *Pichia pastoris*, se realizó el diseño, expresión y purificación de un antígeno recombinante basado en epítopes lineales de las proteínas Gn, Gc y N de virus Andes.

#### 3.3.1. Diseño del antígeno recombinante multiepitópico basado en las proteínas de virus Andes

Se diseñó un antígeno recombinante, basado en las proteínas Gn, Gc y N de virus Andes. Para el diseño del antígeno, se seleccionaron epítopes lineales B presentes en las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes. Se identificó la presencia de epítopes B en el precursor de las glicoproteínas (GPC) de envoltura de virus Andes cepa Chile-971786 (UniProtKB ID: Q9E006) mediante el software predictivo BCPREDS (EL-Manzalawy et al., 2008) (Department of Computational Biology, Institute of Microbial Technology, India). La información obtenida se cotejó con datos experimentales publicados en literatura, en que se realizó mapeo epitópico utilizando bibliotecas de péptidos solapantes. Se seleccionaron 12 epítopes de células B, divididos en 7 péptidos (Figura R28).



MEGWYLVVLGVVYTLTLAMPKTIYELKMECPHTVGLGQGYIIGSTELGLISIEAASDIKLESSCNF  
DLHTTSMAQKSFTQVEWRKKSDDTTTNAASTTFEAQTKTVNLRGTCILAPELYDTLKKVKKT  
VLCYDLTCNQTHCQPTVYLIAPVLTCSIRSCMASVFTSRIQVIYEKTHCVTGQLEGGQCFNPAHT  
LTLSQPAHTYDVTLPISCFFTPKKSEQLKVIKTFEGILTKTGCTENALQGYVCFGLGSHSEPLIVP  
SLEDIRSAEVVSRMLVHPRGEDHDAIQNSQSHLRIVGPITAKVPSSTSDTLKGTAFAGVPMYSSL  
STLVRNADPEFVFSPIVPESNHSTCDKKTVPITWTGYLPISGEMEKVTGCTVFCFLAGPGASCEA  
YSENGIFNISSPTCLVNKVQFRGSEQKINFICQRVDQDVVVCNGQKKVILTKLTVIGQCIYTFT  
SLFSLMPDVVAHSLAVELCVPLHGWA TVMLLSSTFCFGWVLPVAVTLIILKCLRVLTFSCSHYTNE  
SKFKFILEKVKIEYQKTMGSMVCDVCHHECETAKELESHRQSCINGQCPYCMTITEATESALQAH  
YSICKLTGRFQEALKKSLKKPEVKKGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCLLLTCEIVIWAASAETP  
LMESGWSDTAHGVGEIPMKTDLELDFSLPSSSSYSYRRKLTNPANKEESIPFHFQMEKQVIHAEIQ  
PLGHWMDATFNIKTA FH CYGACQKYSYPWQTSKCFEFDYQYETGWGCNPGDCPGVGTGCTA  
CGVYLDKLSV GKAYKIISLKYTRKVCIQLGTEQTCKHIDANDCLVTPSVKVCIVGTVSKLQPSD  
TLLFLGPLEQGGIILKQWCTTSCAFGDPGDMSTPSGMRCPEHTGSFRKICGFATTPVCEYQGNTI  
SGYKRMMATKDSFQSFNLTEPHITNKLEWIDPDGNTRDHVNLVLRDVSFQDLSDNPCKVDL  
HTQAIEGAWGSGVGFLLTCTVGLTECPFSMTSIKACDLAMCYGSTVTNLARGSNVTKVVGKGG  
HSGSSFKCCHDTCSSSEGLLASAPHLERVTGFNQIDSDKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGIL  
NGNWIVVVVLVVLILSIIMFSVLCPRRGHKKTV\*

**Figura R28: Secuencia aminoacídica del precursor de las glicoproteínas de Virus Andes (GPC).** Marcado en amarillo se indican los epítopes lineales B determinados por el software predictivo BCPREDS



Además, se seleccionaron epítopes T presentes en la proteína N de virus Andes. La identificación de epítopes de células T se llevó a cabo mediante análisis de homología de la nucleoproteína de virus Andes y epítopes T encontrados experimentalmente en *Hantavirus* del viejo mundo, descritos en trabajos previos (Ennis et al., 1997; Tuuminen et al., 2007; Van Epps et al., 2002). Se seleccionaron 7 epítopes de células T (Figura R29).

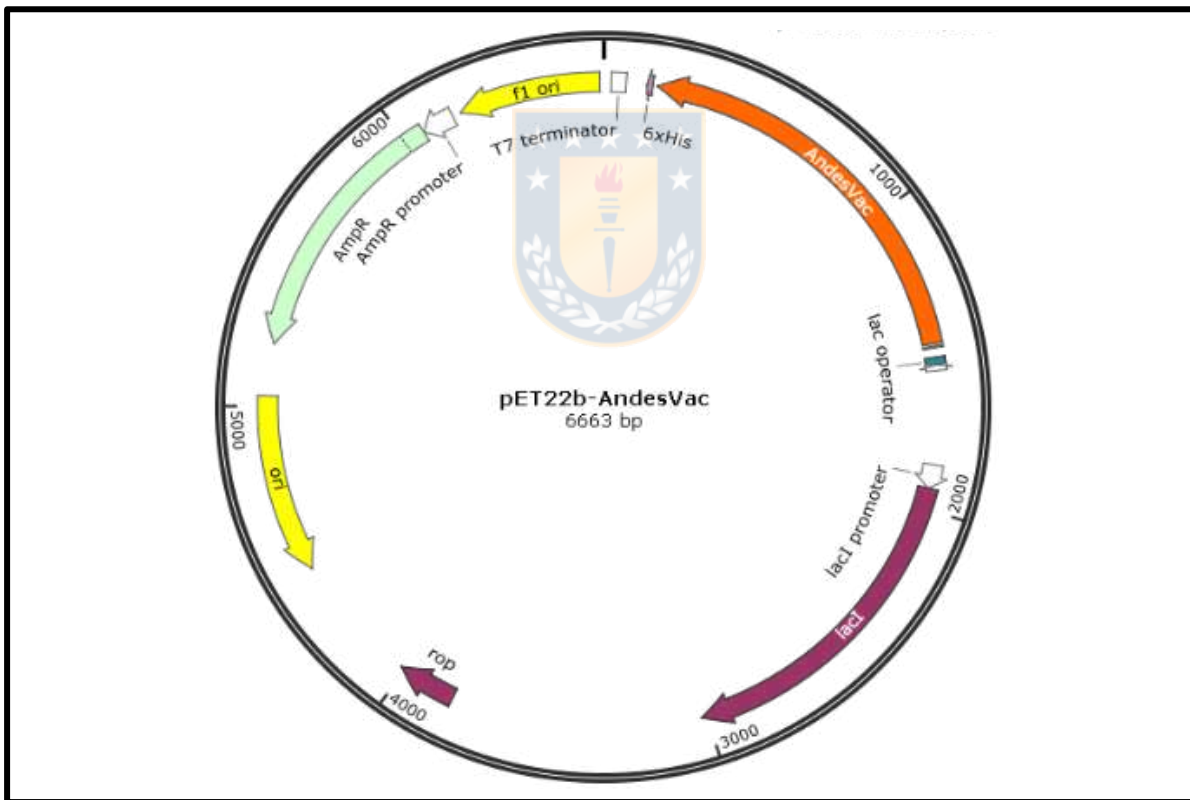
```
MSTLQELQENITAHEQQLVTARQKLKDAEKA VEVD PDDVNKSTLQSRRAAVSTLET KL GELKR
QLADLVAAQKLATKPV DPTGLEPDDHLKEKSSLRYGNVLDVNSIDLEEPSGQTADWKAIGAYIL
GFAIPIILKALYMLSTRGRQTVKDNKGTRIRFKDDSSFEENVNGIRKPKHLYVSMPTAQSTMKAEEI
TPGRFRTIACGLFPAQVKARNIISPVMGVIGFGFFVKDWMDRIEEFLAAECPFLPKPKVASEAFMS
TNKMYFLNRQRQVNESKVQDIIDLIDHAETESATLFT EIA T PHSVWVFACAPDRCPPTALYVAGV
PELGAFSILQDMRNTIMASKSVGTAEELK KKS SAFYQSYLRRTQSMGIQLDQKIILYMLSWGK
EAVNHFHLGDDMDPELRQLAQLSLIDTKVKEISNQEPLKL*
```

**Figura R29: Secuencia aminocídica de la nucleocapside (N) de Virus Andes.** Marcado en fucsia se indican los epítopes T determinados mediante el análisis de homología realizado.

El antígeno recombinante se construyó a partir de las secuencias aminoacídicas de los epítopes seleccionados, separados entre sí por un péptido flexible. En el extremo N-terminal se añadió la secuencia de Linfotactina (XCL1). En el extremo C-terminal se adicionaron 6 residuos de histidina, con la finalidad de facilitar la purificación e identificación de la molécula diseñada (Figura R30). La molécula diseñada se denominó AndesVac, la cual tiene un peso molecular teórico de 43,6 KDa (punto isoeléctrico teórico 9,91). A partir de este diseño, se construyó la secuencia nucleotídica de AndesVac. Para este diseño, se tuvo en consideración la optimización de codones para la expresión de la molécula recombinante en la bacteria *E. coli*. El gen diseñado fue clonado en el vector de expresión pET-22b(+) (Novagen, EE.UU.). El plásmido resultante se denominó pET22b-AndesVac, cuya síntesis fue realizada por la empresa GenScript (República Popular China) (Figura R31).

MRLILALLGICSLTAYIVEGVGSEVSDKRTCVSLLTQRLPVSRIKTYTITEGSLRAVIFITKRGLK  
 VCADPQATWVRDVVRSMDRKSNTNRNMIQTKPTGTQQSTNTAVTLTGTLTLAMPKTIYELKME  
 APHSTSSSTFFTPKKSEQLKVIKTFEGILSTSSTPITAKVPSTSSTLKGTAFAFAGVPMYSSLSTLVRNAD  
 PEFVFSFGSTSSSTLDFSLPSSSSYSYRRKLTNPANKEESSTSSSTRMMATKDSFQSFNSTSSTNLVLN  
 RDVSFQDLSTSSTADLVAAQKLATKPSTSSTGRGRQTVKDNKGTRIRFKDDSSFEVNGIRKPKHL  
 YVSMPTSSSTGLFPAQVKARNIISPVMGSTSSTRIEEFLAAECPFLPKPKVASEAFMSTSTSSTHHH  
 HHH\*

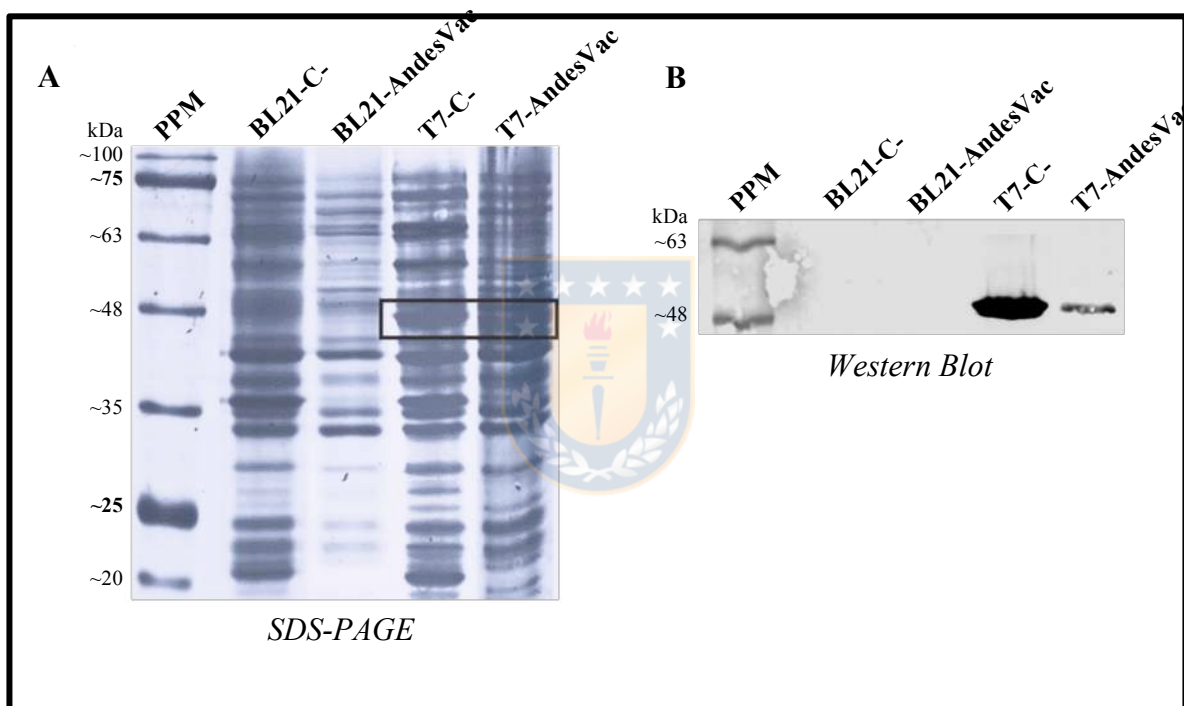
**Figura R30: Secuencia aminocídica del antígeno multiepitópico AndesVac.** Marcado en naranja se indica la secuencia codificante de Linfotactina. En amarillo se indican los epítopes lineales B seleccionados empleando el servidor BC-Preds y en fucsia se indican los epítopes T determinados mediante el análisis de homología realizado, separados por un péptido espaciador. En verde se indica el tag de histidina.



**Figura R31: Constructo para la expresión de AndesVac en bacterias, pET22b-AndesVac.** El gen diseñado, conteniendo epítopes lineales seleccionados desde las glicoproteínas Gn y Gc y la nucleoproteína de virus Andes, la secuencia de Linfotactina y una cola de histidina, se insertó dentro del plásmido pET22-b(+) para su expresión en la bacteria *Escherichia coli* y selección de los clones recombinantes mediante ampicilina.

### 3.3.2. Expresión de AndesVac en bacterias *E. Coli*

Se transformaron bacterias *E. coli* de las cepas BL-21 (DE3) y T7 SHuffle Express, con los vectores pET-22b(+) y pET22b-AndesVac, usando el protocolo de transformación bacteriana por shock térmico. Los clones positivos fueron seleccionados cultivando las bacterias transformadas en agar LB suplementado con ampicilina. Se realizó la inducción mediante IPTG de la expresión de AndesVac a las colonias bacterianas crecidas en este medio selectivo. Posteriormente, se analizó la expresión de proteínas mediante SDS-PAGE y *Western Blot* (Figura R32).



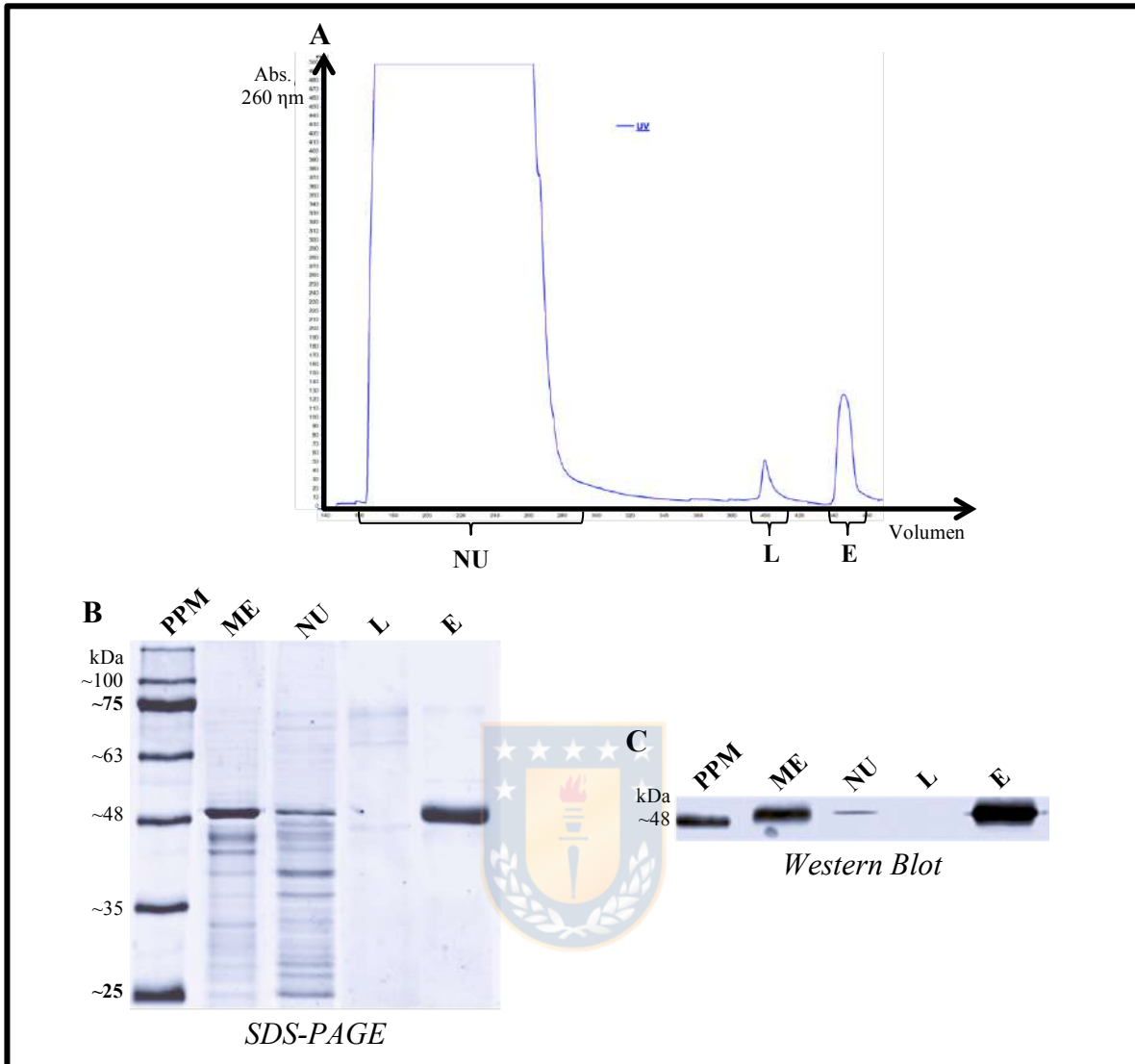
**Figura R32: Análisis de expresión de AndesVac en diferentes cepas de *E. coli*.** **A.** SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. **B.** *Western Blot* utilizando anticuerpo anti-poli-his, condiciones reductoras. **1.** Patrón de peso molecular de proteínas. **2.** *E. coli* BL-21 (DE3) transformada con el plásmido pET22-b(+) (Control negativo). **3.** *E. coli* T7 SHuffle Express (C3029H) transformada con el plásmido pET22-b(+) (Control negativo). **4.** *E. coli* BL-21 (DE3) transformada con el plásmido pET22b-AndesVac. **5.** *E. coli* T7 SHuffle Express (C3029H) transformada con el plásmido pET22b-AndesVac.

Se pudo observar la expresión de una proteína mayoritaria con una movilidad electroforética cercana a los 48 kDa, presente en los clones transformados con el vector pET22b-AndesVac, y ausente en los controles transformados con pET-22b(+). Es posible observar que la cepa BL-21 (DE3) expresa AndesVac en mayor cantidad, y por lo tanto fue la cepa de *E. coli* que se seleccionó para proseguir el proceso de obtención de este antígeno.

### **3.3.3. Producción, solubilización y purificación del antígeno recombinante multiepitópico AndesVac**

Para optimizar los niveles de expresión de AndesVac se determinó el medio de cultivo capaz de proveer la mayor expresión de la proteína por mL de medio utilizado. Para ello, se evaluaron distintos parámetros tales como tipos de medio de cultivo, temperatura y tiempo de inducción, concentraciones de inductor e incorporación de aditivos al medio de cultivo (descrito en Materiales y Métodos).

Para purificar el antígeno AndesVac se utilizó cromatografía de afinidad a iones metálicos inmovilizados (IMAC). Se empleó el equipo Äkta Start® para realizar la purificación, empleando una columna conteniendo la matriz Chelating Sepharose Fast Flow cargada con níquel. Se determinaron las condiciones óptimas de elución de la proteína mediante un gradiente de imidazol de 0 a 300 mM. De este ensayo de purificación, se decidió emplear concentraciones de 5 mM de imidazol para a entrada de la muestra a la columna, 30 mM de imidazol para el lavado y 100 mM de imidazol para la elución de los antígenos recombinantes. Se analizaron las fracciones obtenidas mediante *SDS-PAGE* y Western Blot (Figura R33).



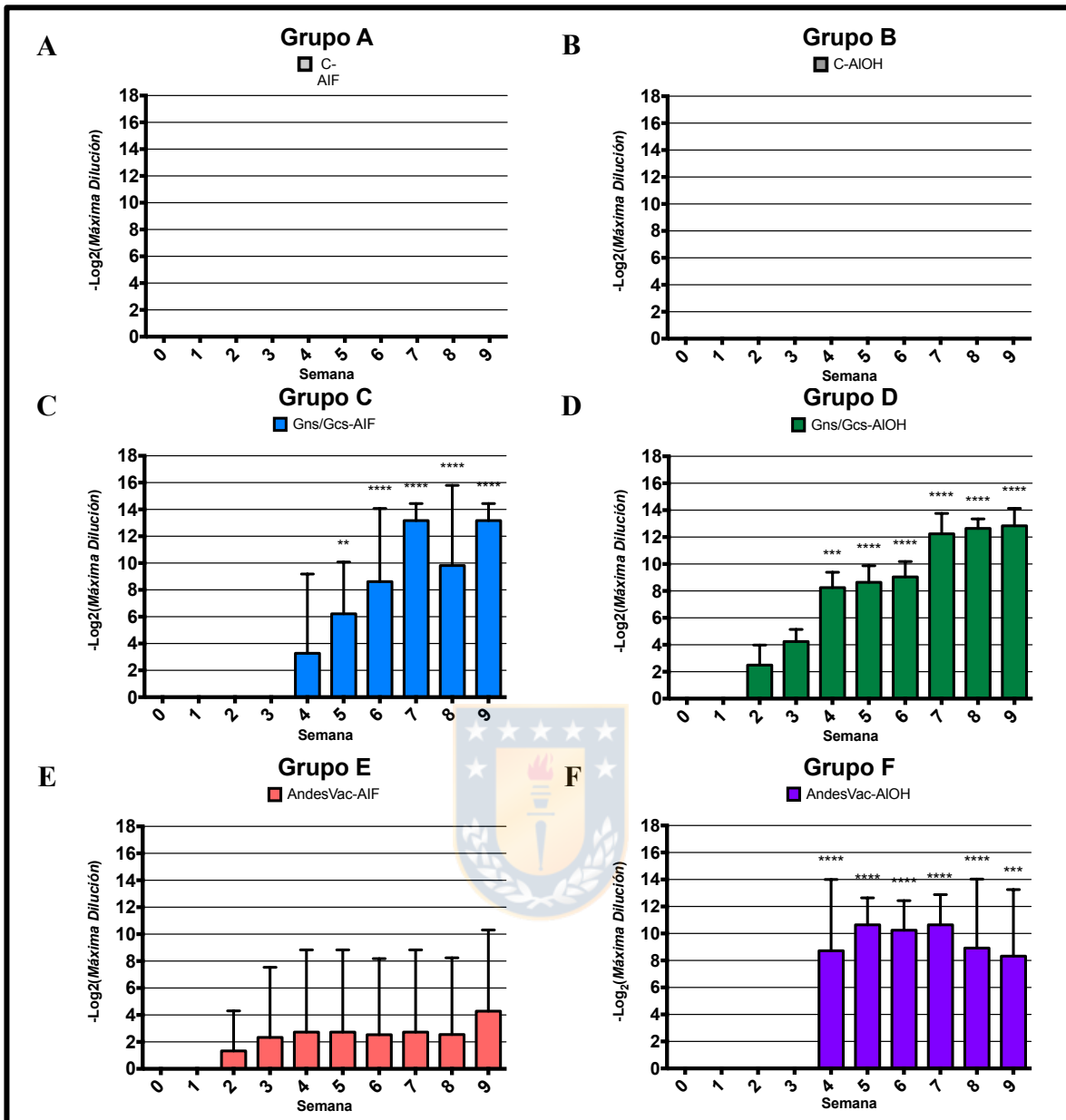
**Figura R33: Purificación del antígeno recombinante AndesVac.** **A.** Cromatograma del proceso de purificación mediante IMAC, indicando la absorbancia a 260 nm en azul. **B.** *SDS-PAGE* 12% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. **C.** *Western Blot* utilizando anticuerpo primario anti-poli-His, condiciones reductoras. **1.** Patrón de peso molecular de proteínas. **ME.** Fracción solubilizada conteniendo el antígeno AndesVac (Muestra de entrada). **NU.** Fracción No-Unida. **L.** Fracción Lavada. **E.** Fracción Eluída.

El análisis densitométrico del *SDS-PAGE* teñido con azul de Coomassie de las fracciones purificada, empleando el software ImageJ, permitió estimar una pureza de AndesVac de un 97,61%. El rendimiento calculado en la producción del antígeno AndesVac sería de 2.56 mg de antígeno por litro de medio de cultivo utilizado (2.56 mg/L).

### **3.4. Evaluación de la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes Gns-Gcs y AndesVac en hámsteres sirios**

#### **3.4.1. Evaluación de los títulos de anticuerpos IgG totales**

Los anticuerpos IgG totales se titularon mediante ELISA. Para ello, se fijaron 0,5µg del antígeno correspondiente en el fondo de placas de 96 pocillos high binding (Corning®), y se hicieron diluciones seriadas del suero colectado. La detección se hizo con un anticuerpo secundario anti-IgG de hámster conjugado con HRP (ThermoFisher Scientific). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura R34. Los hámsteres pertenecientes al grupo D comenzaron a desarrollar anticuerpos específicos desde la segunda semana después de la primera vacunación, mientras que los hámsteres pertenecientes a los grupos C y F no los desarrollaron sino hasta la cuarta semana. En general, los títulos se elevaron después de cada reinmunización en los días 21 y 42. Los títulos de anticuerpos IgG totales variaron entre cada grupo experimental: En el grupo C se alcanzaron títulos promedio de 1/9.200 ( $13.17 \pm 1,27 \text{ Log}_2$ ), en el día 63 del ensayo. El grupo D alcanzó un título promedio en torno a 1/7.300 ( $12.84 \pm 1,29 \text{ Log}_2$ ), en el día 63 del ensayo, siendo el grupo que presentó una mejor respuesta. En tanto, en el grupo E no se encontraron niveles significativos de anticuerpos IgG totales. En el grupo F se alcanzaron títulos promedio de 1/1.600 ( $10.64 \pm 2,00 \text{ Log}_2$ ), en el día 35 del ensayo. Debido a que el grupo D, inmunizado con el candidato vacunal conteniendo los antígenos Gns y Gcs utilizando Alhydrogel como adyuvante, presentó mejores resultados durante todo el periodo analizado, los análisis posteriores sólo se hicieron para las muestras obtenidas desde este grupo.



**Figura R34: Gráficos con los títulos de anticuerpos IgG totales inducidos en los hámsteres inmunizados con las distintas formulaciones vacunales. A. Títulos de anticuerpos IgG totales obtenidos semanalmente en el grupo A. B. Títulos de anticuerpos IgG totales obtenidos semanalmente en el grupo B. C. Títulos de anticuerpos IgG totales obtenidos semanalmente en el grupo C. D. Títulos de anticuerpos IgG totales obtenidos semanalmente en el grupo D. E. Títulos de anticuerpos IgG totales obtenidos semanalmente en el grupo E. F. Títulos de anticuerpos IgG totales obtenidos semanalmente en el grupo F. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE. (ANOVA de dos vías, seguido de test de Dunnet de múltiple comparación; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).**

### 3.4.2. Evaluación de los títulos de anticuerpos neutralizantes

#### 3.4.2.1. Generación de vectores lentivirales seudotipados con las glicoproteínas de superficie Gn y Gc de virus Andes

Para caracterizar la respuesta serológica de anticuerpos neutralizantes inducida por los antígenos Gns y Gcs, fue necesario construir un vector lentiviral seudotipado con las moléculas nativas Gn y Gc. Para ello, se diseñó un plásmido conteniendo la secuencia nucleotídica del precursor de las glicoproteínas (GPC) de virus Andes cepa Chile-971786 (UniProtKB ID: Q9E006). La secuencia fue analizada y modificada para eliminar sitios potenciales de *splicing*, corte, terminación temprana de la transcripción y de poliadenilación. Se optimizó el uso de codones para su expresión en células de mamíferos, y fue clonada en el plásmido pCMV6-Entry (Origene, EE.UU.). Su síntesis fue realizada por la empresa BlueHeron (EE.UU.), dando origen al plásmido pEntry-GPC (Figura R35).

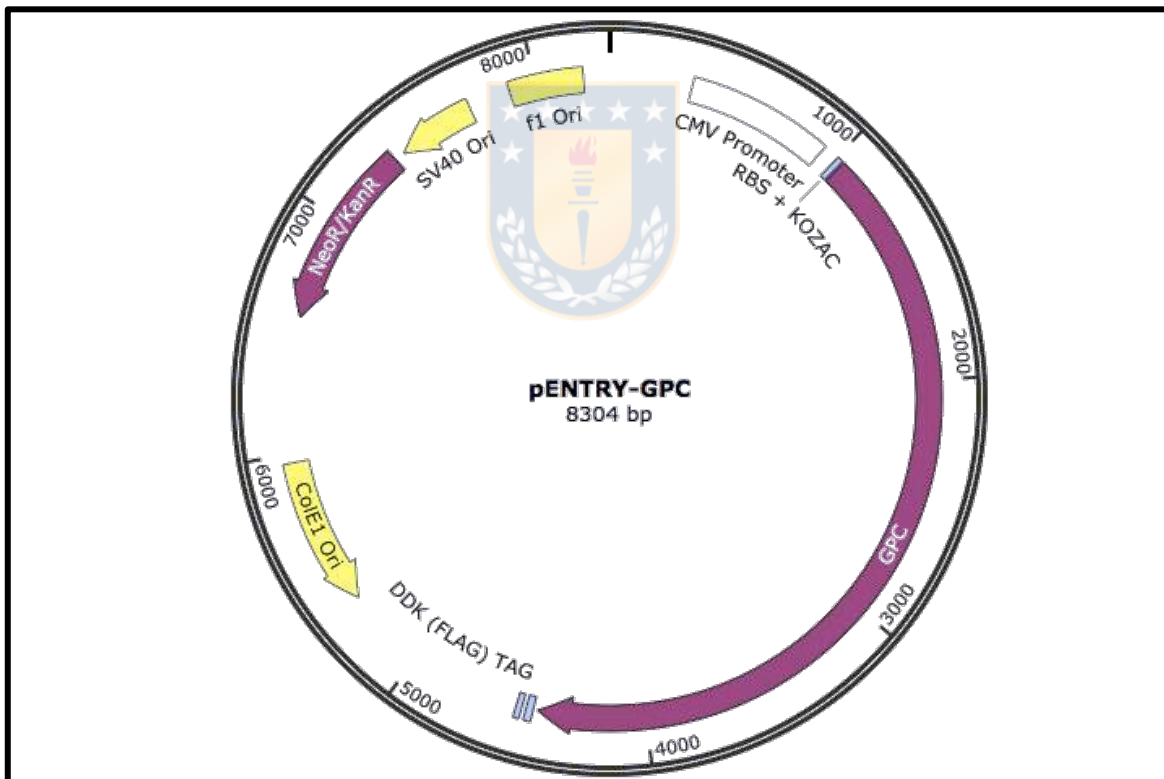
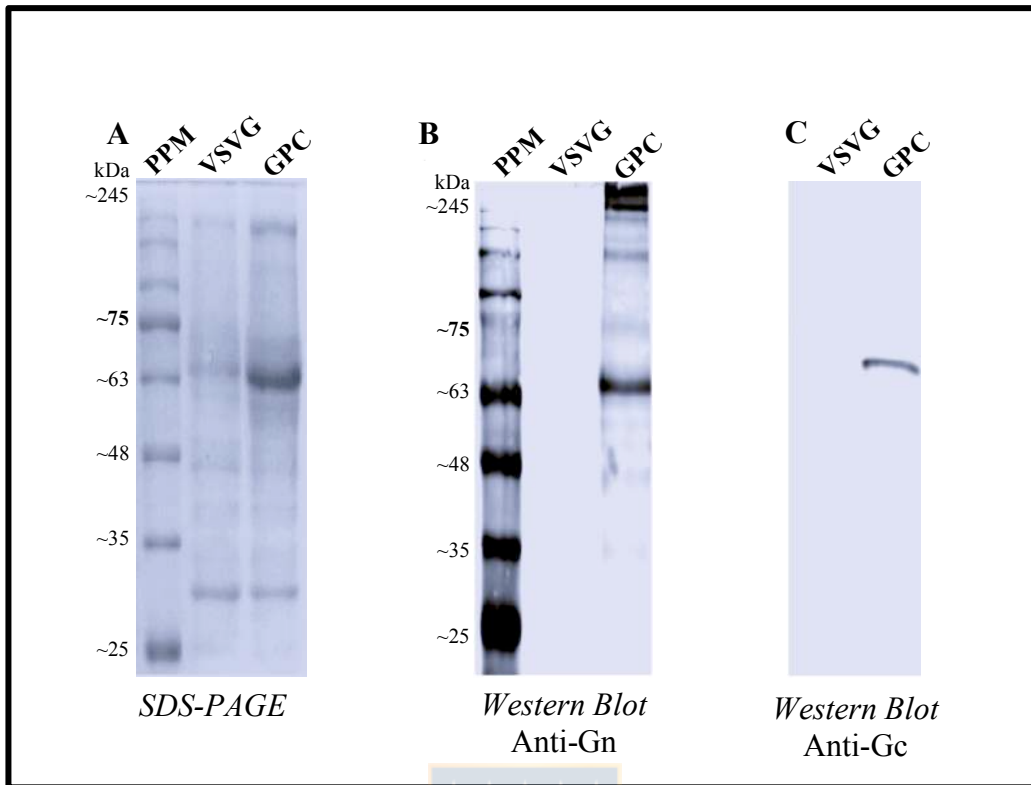


Figura R35: Constructo para la generación de vectores lentivirales seudotipados con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes. Mapa del plásmido pEntry-GPC.

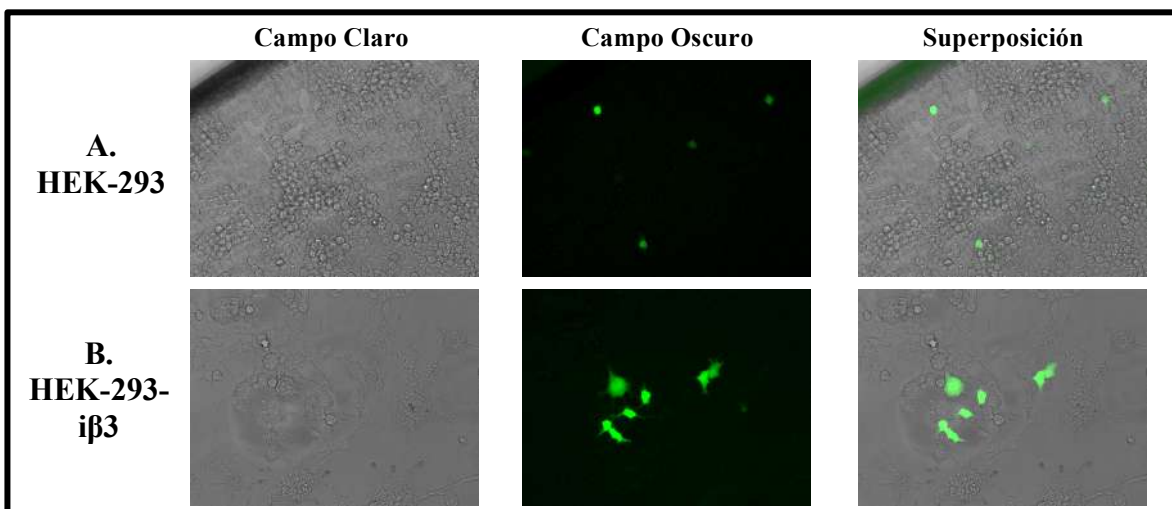


Se comprobó el funcionamiento del plásmido a través de la transfección de células con este plásmido y posterior detección de Gn y Gc mediante inmunocitoquímica. Comprobado su funcionamiento, fue empleado para la generación de vectores lentivirales pseudotipados. La construcción del vector lentiviral pseudotipado se realizó empleando el kit comercial ViraPower™ Lentiviral Expression Systems (Invitrogen, EE.UU.) que consta de los plásmidos pLP1, pLP2 y pLP/VSVG. Para generar las partículas lentivirales pseudotipadas con las glicoproteínas Gn y Gc se reemplazó el plásmido pLP/VSVG por pEntry-GPC. Además, se usó el plásmido pLGW como vector y control de transfección e infección, ya que codifica para la proteína fluorescente verde mejorada (*enhanced Green Fluorescent Protein*, eGFP) como marcador de la eficiencia de transfección y de la producción de vectores lentivirales. De esta manera, para producir los vectores lentivirales pseudotipados con las glicoproteínas de superficie de virus Andes, se utilizaron los plásmidos pLP1, pLP2, pLGW y pEntry-GPC. Estos vectores lentivirales fueron denominados Lenti-GPC. Adicionalmente, se produjeron vectores lentivirales que expresan en su superficie la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSVG, para lo cual se emplearon los plásmidos pLP1, pLP2, pLGW y pLP/VSV. Estos vectores lentivirales, empleados como control, se denominaron Lenti-VSVG. Para la generación de los vectores lentivirales, se co-transfectaron los plásmidos correspondientes en células HEK-293FT mediante el método descrito por Toledo y Cols. (Toledo et al., 2009). Finalizada la producción de los vectores lentivirales se procedió a concentrarlos mediante ultracentrifugación. La producción de ambos vectores lentivirales se realizó bajo las mismas condiciones. Los vectores lentivirales producidos fueron analizados mediante *SDS-PAGE* y Western Blot empleando anticuerpos específicos contra las glicoproteínas de virus Andes Gn y Gc (Figura R36). Estos ensayos permitieron demostrar la expresión de las glicoproteínas Gn y Gc en el vector lentiviral pseudotipado Lenti-GPC.



**Figura R36: Evaluación de la expresión de Gn y Gc en la superficie de vectores lentivirales seudotipados con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes. A. SDS-PAGE 12% teñido con azul de Coomassie, condiciones reductoras. B. Western Blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gn, condiciones reductoras. C. Western Blot utilizando anticuerpo monoclonal anti-Gc, condiciones reductoras. PPM. Patrón de peso molecular de proteínas. VSVG. Lenti-VSVG: Vector lentiviral control. GPC. Lenti-GPC: Vector lentiviral seudotipado con las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes.**

Finalmente, se evaluó la capacidad del vector Lenti-GPC de transducir células. Para esto, se emplearon células HEK-293 o HEK-293- $\beta$ 3. Los vectores lentivirales seudotipados fueron capaces de transducir ambos tipos celulares, pero más eficientemente las células HEK-293- $\beta$ 3 (Figura R37).



**Figura R37: Transducción de células por Lenti-GPC. A.** Células HEK-293 transducidas con Lenti-GPC. **B.** Células HEK-293- $\beta$ 3 transducidas con Lenti-GPC. Aumento 460X.

#### 3.4.2.2. Determinación del título de anticuerpos neutralizantes

Los títulos de anticuerpos neutralizantes (AcN) se determinaron en un mediante el uso del vector lentiviral seudotipado con las proteínas Gn y Gc del virus Andes. El título de anticuerpos neutralizantes se expresó como el logaritmo en base dos del recíproco de la última dilución de plasma que neutralizó las  $10^2$  partículas infectivas del vector lentiviral seudotipado con Gn y Gc. En este ensayo los anticuerpos neutralizantes comenzaron a detectarse desde la segunda semana, después de la primera vacunación, alcanzando títulos promedio en torno a los  $1/1.300$  ( $10.39 \text{ Log}_2$ ), en el día 63 del ensayo (Figura R38).

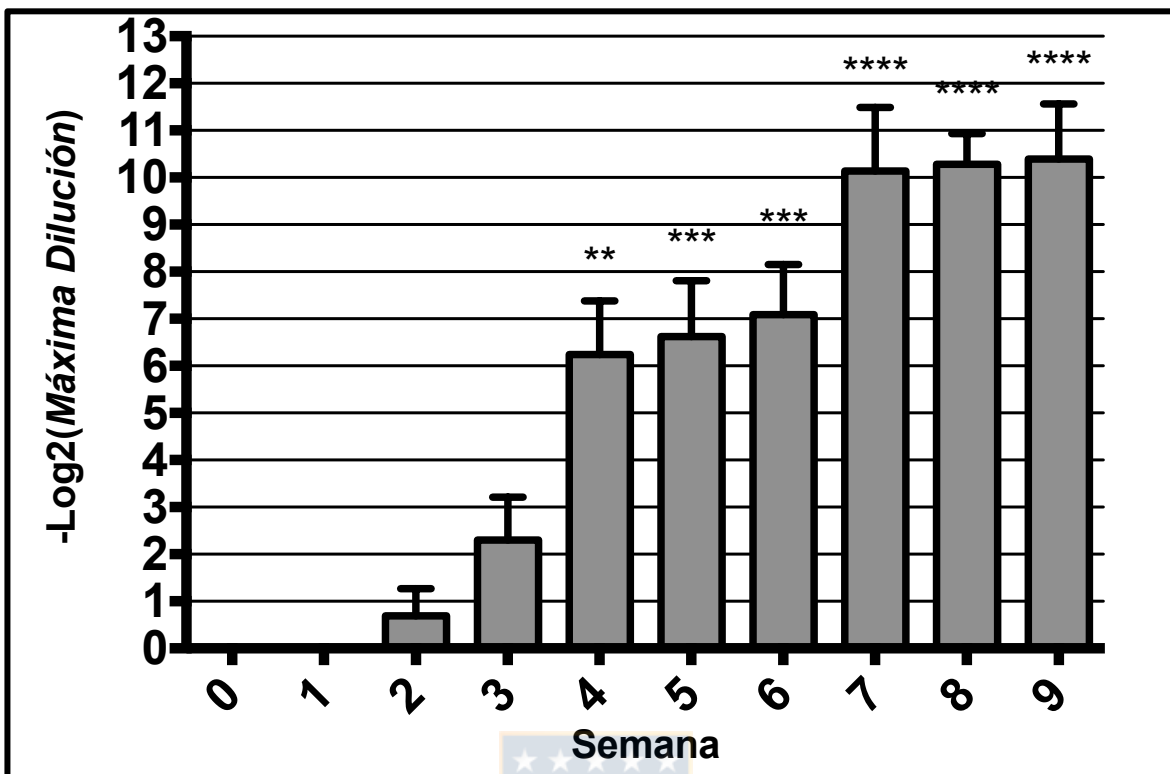
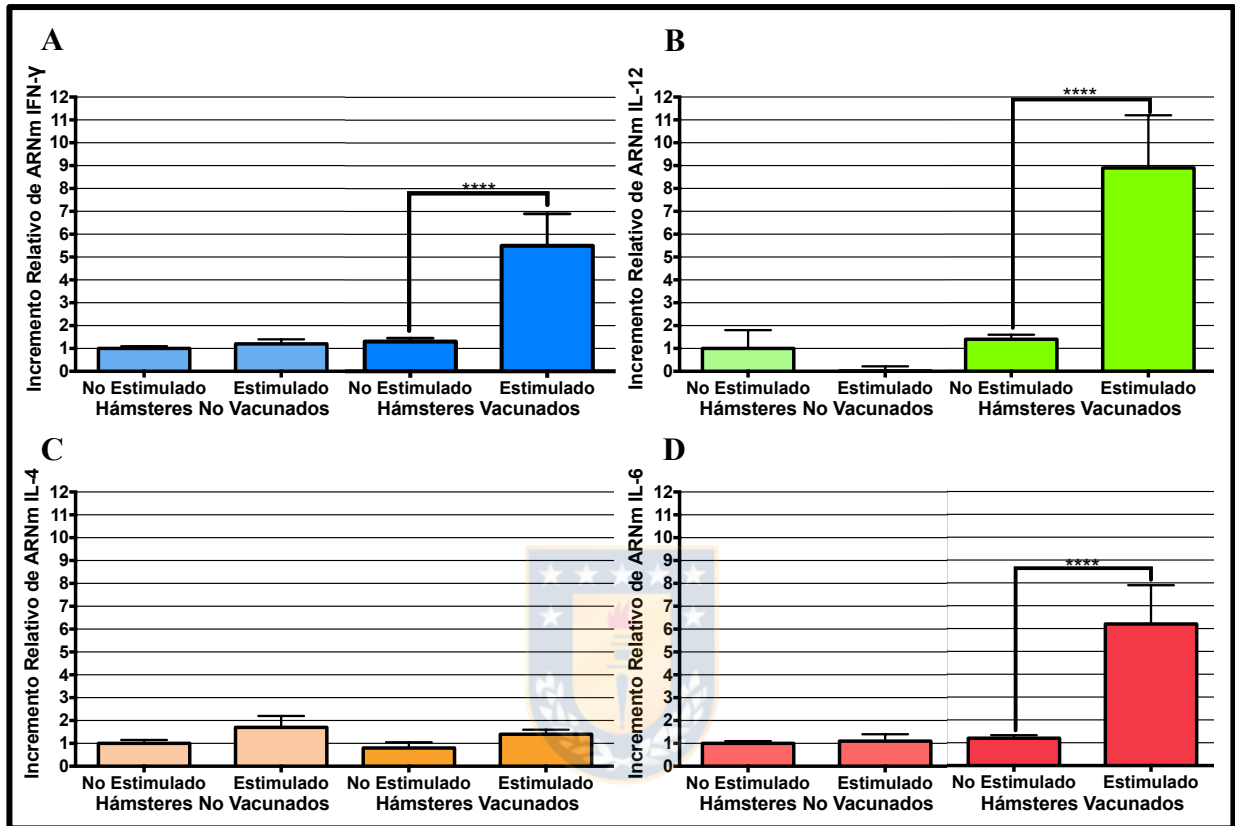


Figura R38: Gráfico con los títulos de anticuerpos neutralizantes inducidos en los hámsteres inmunizados con el complejo Gns-Gcs usando Hidróxido de aluminio como adyuvante. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE. (ANOVA de dos vías, seguido de test de Dunnet de múltiple comparación; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ )

### 3.4.3. Evaluación del perfil de citoquinas

Los esplenocitos extraídos a cada hámster se dividieron y sembraron en dos pocillos en una placa 24 pocillos. Uno de los pocillo se estimuló por 24 horas con el complejo antigénico Gns/Gcs a un concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , mientras que el otro pocillo no recibió estimulación. Pasadas 24 horas, se purificó el ARNm desde los esplenocitos. Se evaluó los niveles relativos de ARNm de citoquinas vinculadas a distintos perfiles de respuesta de linfocitos TH<sub>1</sub> o TH<sub>2</sub> mediante RT-qPCR. Para ello, se emplearon oligonucleótidos específicos para los genes IFN- $\gamma$ , IL12, IL4 e IL6. Como normalizador se empleó la proteína ribosomal L18.. Las diferencias relativas entre los niveles de ARN de cada citoquina en los esplenocitos estimulados, con respecto a los no estimulados, se determinaron mediante el método  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (Figura R39).

En los esplenocitos estimulados de animales inmunizados se pudo observar una elevación significativa en los niveles de  $IFN\gamma$  (Figura R39A), IL-12 (Figura R39B) e IL-6 (Figura R39D). No se observó elevación significativa en los niveles de IL-4 (Figura R39C).



**Figura R39: Perfil de citoquinas inducido por los antígenos recombinantes Gn y Gc.**

**A.** Gráfico con variación en los niveles relativos de RNA de interferón gamma en esplenocitos estimulados con los antígenos Gn y Gc. **B.** Gráfico con variación en los niveles relativos de RNA de IL-12. en esplenocitos estimulados con los antígenos Gn y Gc. **C.** Gráfico con variación en los niveles relativos de RNA de IL-4. en esplenocitos estimulados con los antígenos Gn y Gc. **D.** Gráfico con variación en los niveles relativos de RNA de IL-6. en esplenocitos estimulados con los antígenos Gn y Gc. Los valores representan el promedio  $\pm$  SE. (ANOVA de dos vías, seguido de test de Bonferroni de múltiple comparación; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

## 4. DISCUSIÓN

### 4.1. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en células de mamíferos

El análisis bioinformático realizado en la secuencia del precursor de glicoproteínas de virus Andes, tenía como finalidad la generación de variantes solubles y secretables de ambas glicoproteínas. Para ello, se diseñaron los antígenos denominados sGn y sGc. Se decidió usar como primera aproximación su expresión en células de mamíferos debido a que los Hantavirus infectan distintos tipos de células de mamíferos, por lo estimamos que en este tipo celular se debería lograr la expresión óptima de los antígenos diseñados. Esto teniendo en cuenta que son proteínas glicosiladas y con una estructura compleja, ya que interactúan consigo mismo y entre ellas (Battisti et al., 2011; Hepojoki et al., 2010; Hepojoki et al., 2012). Si bien ambos antígenos recombinantes fueron expresados en células de mamíferos, el antígeno sGn permaneció retenido intracelularmente. Este patrón de expresión de la molécula sGn no se esperaba, dada la eliminación previa de regiones hidrofóbicas que promoviesen su retención en membranas de organelos celulares reportadas previamente (Gerrard & Nichol, 2002; Matsuoka et al., 1994). Además, el análisis con los programas TMHMM 2.0 (Sonnhammer et al., 1998), TOPCONS (Tsirigos et al., 2015) y PSORTII (Nakai & Horton, 1999) confirmó la eliminación de dichas secuencias.

Según lo observado mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*, ambas variantes solubles poseen un peso molecular de entre 50 y 55 kDa. Esto se condice con las tallas esperadas según el análisis de sus secuencias aminoacídicas. sGn tendría un peso molecular de 44,3 kDa. Sin embargo, también contiene 3 sitios potenciales de N-glicosilación que podrían contribuir a incrementar su tamaño. En tanto, el antígeno sGc tendría peso molecular de 51,4 kDa, no obstante, la molécula posee 1 sitio potencial de N-glicosilación que podría contribuir a incrementar su talla.

Luego del proceso de purificación, fue posible obtener los antígenos con un alto nivel de pureza (91% y 88%). Sin embargo, el rendimiento no fue el esperado (14 µg/mL y 2,59 µg/mL). Considerando que la expresión de proteínas recombinantes mediante la transducción celular con vectores adenovirales ha sido ampliamente utilizado, principalmente por su capacidad de permitir un alto rendimiento, descartamos que sea debido a esto (Sánchez et al., 2004, 2008; Toledo et al., 2008).

Por otra parte, la línea celular SiHa ha sido ampliamente utilizada para la producción de proteínas recombinantes, incluido trabajo realizado en nuestro laboratorio (Parra et al., 2019). Esto hace suponer que sería el modelo inicial y las características inherentes a las proteínas Gn y Gc, las que en sí serían las responsables de su baja producción y, probablemente, también de la retención de sGn en el interior celular. Esto podría ser debido que al eliminar las regiones transmembrana e hidrofóbicas, podría verse alterado el plegamiento de las glicoproteínas. Así, quedarían expuestas regiones que habitualmente no se encuentran expuestas en las glicoproteínas nativas, dando origen a estos eventos.

Cabe destacar el reconocimiento de las moléculas sGn y sGc por el suero de pacientes previamente infectados con el virus Andes. Esto nos permite sugerir la conservación de epítopes naturalmente expuestos en las glicoproteínas nativas del virus Andes. Esto es una característica altamente deseable en proteínas a ser utilizadas en la formulación de un candidato vacunal. Sin embargo, debido a los bajos niveles de expresión de ambas moléculas, su producción es difícilmente escalable para su utilización con este propósito. Aún así, este constituye la primera publicación en la cual se logró la expresión de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes (Beltrán-Ortiz et al., 2017).

#### **4.2. Diseño, expresión y purificación de variantes solubles de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris***

Basados en los resultados obtenidos de la expresión de los antígenos recombinantes sGn y sGc en células de mamíferos, decidimos diseñar antígenos recombinantes basados en las regiones expuestas de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes para su expresión en levaduras. De esta forma, esperábamos superar las dificultades relacionadas a la baja producción de antígenos, pero conservando características de éstas moléculas altamente deseables en un candidato vacunal. Se realizaron numerosos e infructuosos intentos de realizar la co-expresión de los antígenos a través de la transformación de levaduras con un único constructo conteniendo los *cassettes* para la expresión de ambos antígenos. Esto nos llevó a trabajar en la generación de clones de levaduras capaces de producir sólo uno de los antígenos. De esta forma, se obtuvieron dos clones capaces de secretar el antígeno recombinante basado en las regiones expuestas de la glicoproteínas Gn de virus Andes, denominado Gns.

Sin embargo, contrario a lo esperado, el antígeno no se presentaba en forma monomérica, sino formando agregados de distintos pesos moleculares y presumiblemente de variable composición. Los resultados se condicen con lo reportado en literatura, donde se ha mencionado que las glicoproteínas Gn y Gc parecen requerir su co-expresión para su correcto plegamiento y y la formación de estructuras superiores por interacción entre ambas glicoproteínas (Cifuentes-Muñoz et al., 2014; Deyde et al., 2005; Hepojoki et al., 2010; Ruusala et al., 1992). Además, existen estudios donde se demuestra la asociación entre glicoproteínas del mismo tipo (Interacciones Gn-Gn y Gc-Gc) en hantavirus (Rissanen et al., 2017; Sperber et al., 2019). Sin embargo, este evento dificultó la purificación del antígeno y por lo tanto proseguir el desarrollo del candidato vacunal con este único antígeno. Adicionalmente, siempre tuvimos como objetivo basar nuestro candidato vacunal en ambas glicoproteínas. De esta forma, se re-transformo el clon C4-G1, que expresa en el medio de cultivo al antígeno recombinante Gns, para co-expresar también el antígeno Gcs. Los antígenos no fueron secretados al medio de cultivo, sino que ahora ambos quedaban retenidos en el interior de las levaduras, contrario a lo esperado. Descartamos que esto se deba a algún problema en el factor de secreción incorporado en ambos antígenos, ya que se había demostrado su funcionalidad al secretar a Gns anteriormente. Estimamos más probable que esto se deba a la formación de agregados de alto peso molecular por la interacción entre ambos antígenos. Esta explicación coincide con lo observado al analizar los antígenos mediante *SDS-PAGE* y *Western Blot*, donde es posible observar la presencia de los antígenos a una altura esperable para su estado monomérico, pero también la aparición de agregados de alto peso molecular, incluso muchos de los cuales no serían capaces de ingresar a los geles de poliacrilamida. La aparición de agregados de alto peso molecular sugiere que ambas glicoproteínas estarían interactuando entre sí. Esto es particularmente interesante, si se toma en consideración que se ha descrito que en el virus nativo ambas glicoproteínas interaccionan entre sí formando un patrón particular en la superficie del virus (Battisti et al., 2011; Cifuentes-Muñoz et al., 2014; Hepojoki et al., 2010). La presencia de estas estructuras nos hace suponer que el plegamiento de los antígenos recombinantes sería similar al de las glicoproteínas nativas de virus Andes, si bien se requieren más estudios, sobre todo análisis estructurales, para confirmar esta hipótesis.



Fue necesario utilizar técnicas muy ásperas para lograr la solubilización de ambos antígenos, tal como altas concentraciones de un agente caotrópico, condiciones reductoras, pH muy básico y calor. Aún así, muchos de los agregados de alto peso molecular permanecieron en esta misma condición. Esto sugiere una interacción bastante estable entre ambos antígenos en la formación de estas estructuras superiores. Sin embargo, fue posible realizar la purificación de los antígenos con un grado de pureza bastante alto de acuerdo a lo determinado densitométricamente (mayor al 95%) y con escasa pérdida en el proceso. Posteriormente se realizó el replegamiento de los antígenos recombinante. Esto consiste un paso crucial para el correcto plegamiento de los antígenos. De esta forma, buscamos la presencia de epítopes tanto lineales como conformacionales en el candidato vacunal en desarrollo.

Indicios del correcto plegamiento fue estimado mediante determinación de cambios en la motilidad electroforética de los antígenos antes y después del proceso de replegamiento, en condiciones no reductoras. Pudimos observar la desaparición de las bandas correspondientes a los antígenos en su estado monomérico, y la aparición únicamente de agregados de alto peso molecular. Adicionalmente, la solución conteniendo a los antígenos pasó a tener un nivel de turbidez observable a simple vista, sin embargo los agregados no precipitaron al someterlo a centrifugaciones a alta velocidad (sobre 12.000 rpm). Además, estos agregados han sido capaces de pasar a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$ . Todo esto nos indica la formación de agregados de alto peso molecular, pero sin llegar a formar partículas tipo virus (*Virus-Like Particles*, VLPs). De manera interesante, al transfectar células de mamíferos con las secuencias completas de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes, sí es posible obtener VLPs (Acuna et al., 2014). Esto sugiere que son necesarias las regiones eliminadas en nuestras secuencias de los antígenos Gns y Gcs (en particular, las regiones transmembrana) para la generación de VLPs, pero no para la interacción entre ambas glicoproteínas. Sería interesante realizar análisis que permitan determinar o estimar el plegamiento adoptado de los antígenos Gns y Gcs, y compararlo con la información que existe en cuanto a estructura propuesta para las glicoproteínas de distintos hantavirus. En el contexto de su uso como candidato vacunal, también podrían evaluarse la permanencia de epítopes descritos por mapeo epítópico encontrados en la superficie del virus Andes y otros hantavirus (Levanov et al., 2019; S. Li et al., 2016), a fin de evaluar la permanencia de epítopes en los antígenos replegados.

Adicionalmente, analizamos la presencia de glicosilaciones en los sitios potenciales de glicosilación de cada uno de los antígenos recombinantes. De acuerdo a estos ensayos, Gns no tendría ocupado ninguno de sus sitios potencial de N-glicosilación. En tanto Gcs sí tendría ocupado su único sitio potencial de N-glicosilación. Aún así, se destaca la presencia de dos bandas a distinta altura para el antígeno Gcs. En vista de lo señalado, parece ser que las dos poblaciones difieren de la presencia o no de la secuencia de la señal de secreción, y no en cuanto a sus glicosilación. Haciendo este análisis, los pesos moleculares observados para los antígenos recombinantes observados mediante *Western-Blot* se condicen con los predichos de manera teórica. Si bien existen estudios en literatura que sugieren que la presencia de glicosilaciones en las glicoproteínas Gn y Gc estarían involucradas en el correcto plegamiento de las proteínas (Shi & Elliott, 2004), también existe evidencia respecto a proteínas que no mantienen el patrón de glicosilación nativo y aún así adoptan un plegamiento correcto (Shental-Bechor & Levy, 2008, 2009).

Teniendo en cuenta las características de los antígenos recombinantes desarrollados, así como de la escalabilidad de su proceso productivo, consideramos que estos antígenos tienen el potencial de ser producidos y utilizados para la formulación de una vacuna.

#### **4.3. Diseño, expresión y purificación de un antígeno recombinante multiepitópico basado en las proteínas de virus Andes**

El diseño del antígeno recombinante AndesVac fue realizado mediante selección de epítopes lineales B y T. Se trabajo en esta alternativa debido a los pobres resultados productivos obtenidos al realizar la producción de antígenos basados en las glicoproteínas Gn y Gc en células de mamíferos (Beltrán-Ortiz et al., 2017) así como a las dificultades enfrentadas durante la expresión de los antígenos recombinantes en levaduras. Si bien se emplearon diversos programas bioinformáticos para hacer una buena selección de los epítopes de tipo B a incluir, todos los epítopes incorporados fueron posteriormente confirmados mediante información disponible en literatura (Arikawa et al., 1989; Heiskanen et al., 1999; Hjelle et al., 1994; Wang et al., 1993). Además, se añadió la secuencia codificante para Linfotactina. Se seleccionó esta citoquina debido a que es un polipéptido pequeño, cuya principal función caracterizada es la atracción de células dendríticas (*Dendritic Cells*; DCs) y participación en la activación de la respuesta inmune citotóxica (Lei & Takahama, 2012).

De esta forma, se espera que su presencia en el antígeno AndesVac facilite su incorporación a DCs y de esta forma, el antígeno sea presentado más eficientemente a Linfocitos T CD8+, responsables de la respuesta inmune contra patógenos intracelulares como virus. Por otra parte, se eliminaron cisteínas presentes en la secuencia del antígeno diseñado y fueron reemplazados por alaninas. Este cambio fue realizado con la finalidad de facilitar los pasos posteriores de expresión, solubilización y purificación, al evitar la formación de enlaces disulfuro entre moléculas de AndesVac.

Debido a las características de este antígeno, su expresión, solubilización y purificación pudieron realizarse de manera más sencilla respecto a otros antígenos mencionados en el presente trabajo. El proceso fue optimizado para poder asegurar la escalabilidad del proceso en caso de ser requerido.

#### **4.4. Evaluación de la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes Gns-Gcs y AndesVac en hámsteres sirios**

Al evaluar la respuesta inmune desarrollada en hámsteres sirios, se desarrolló un esquema basado en una inmunización inicial seguido de dos potenciadores. Se eligió este esquema porque es el utilizado habitualmente en seres humanos con vacunas cuyos antígenos son de tipo recombinante, las cuales también consisten en antígenos basados en proteínas de la superficie de virus producidos en levaduras (Hilleman, 1987; Wheat, 2008). Se decidió emplear dos adyuvantes distintos, de manera separada, para evaluar la inmunogenicidad de los antígenos recombinantes. Se utilizó Adyuvante Incompleto de Freund, el cual ha sido ampliamente caracterizado y usado a nivel experimental y veterinario. Fue elegido porque se ha demostrado que genera una potente respuesta inmune de tipo Th1 (Chang et al., 1998), ideal para una respuesta inmune contra patógenos de tipo intracelular como el virus Andes. Si bien actualmente no se emplea en seres humanos, existen otros adyuvantes de tipo aceite en agua, como MF59 (O'Hagan et al., 2013), cuyo uso podría analizarse en experimentos futuros. El otro adyuvante utilizado corresponde a Hidróxido de Aluminio (Alhydrogel). Los adyuvantes basados en sales de aluminio han sido los más empleados en vacunas de seres humanos (Chan et al., 2017; Mbow et al., 2010, 2011), si bien se caracterizan por generar una respuesta inmune de anticuerpos, asociada principalmente a la protección frente a parásitos y microorganismos extracelulares, según lo observado en ratones, y una respuesta mixta en seres humanos (HogenEsch, 2012).

Aún así, este adyuvante ha sido empleado con éxito en vacunas de subunidades contra patógenos intracelulares, como lo son la vacuna contra la Hepatitis B y la vacuna contra el Virus del Papiloma Humano (Hilleman, 1987; Siddiqui & Perry, 2006; Szarewski, 2010).

La inmunización fue realizada en hámsteres sirios porque, como se ha mencionado anteriormente, corresponde al modelo animal de SCPH. De manera interesante, el desarrollo de esta patología ocurre únicamente al ser expuestos al virus Andes (Hooper et al., 2001) o al virus Maporal (Milazzo et al., 2002), un hantavirus no patogénico en seres humanos. Debido al desarrollo de SCPH al ser expuestos a virus Andes, son una herramienta invaluable en el desarrollo de tratamientos y vacunas contra patologías causadas por este virus. Adicionalmente, el hámster sirio se utiliza ampliamente para estudiar la patogenia de distintas infecciones, debido a la similitud de su respuesta inmune contra patógenos con la de seres humanos (Miao et al., 2019). Sin embargo, hay que tener en consideración desventajas de su uso. Entre ellas, se debe tener en consideración que aún están en desarrollo herramientas que permitan evaluar de manera satisfactoria su respuesta inmune (Warner et al., 2017), mientras que para otras especies existen gran número de alternativas. También se debe considerar que, aunque se ha descrito similitudes en su respuesta inmune contra patógenos respecto a la humana, al ser especies distintas pueden presentar diferencias importantes que deben ser evaluadas y tomadas en consideración, por ejemplo en cuanto al procesamiento y presentación de antígenos, lo que puede llevar a una respuesta inmune totalmente diferente. En el caso particular de este trabajo, también se debe considerar que los animales empleados no son iguales genéticamente, por lo que las diferencias observadas dentro de cada grupo pueden deberse a esta razón.

Inicialmente, evaluamos los títulos de anticuerpos tipo IgG totales para todos los grupos inmunizados. Como fue de esperar, no se vio un aumento significativo del título de anticuerpos IgG totales en los grupos controles. De los grupos inmunizados con el antígeno AndesVac sólo se obtuvo una respuesta significativa para el grupo en que se empleó como adyuvante Alhydrogel, con un título promedio de 1/1.600 ( $10.64 \pm 2,00 \text{ Log}_2$ ) hacia el día 35 post-inmunización. Estos resultados no difieren de aquellos obtenidos en otros prototipos de vacunas contra Virus Andes, en que los títulos de anticuerpos generados fluctúan entre concentraciones de 1:2.000 y 1:400 (Brown et al., 2011; Custer et al., 2003; Hooper et al., 2008; Prescott et al., 2014). Por otra parte, cabe destacar que la selección de epítopes realizado en el diseño del antígeno AndesVac fue realizado buscando generar una respuesta inmune en seres humanos.

Hay que tener en cuenta que la generación de una respuesta inmune varía entre especies, con diferencias considerables en el procesamiento y presentación antigénicos. Por lo tanto, cabe la posibilidad de que este antígeno presentara diferencias notables de ser administrado a seres humanos, para quienes fue diseñado, y esta podría ser una explicación a la ausencia de títulos significativos de anticuerpos IgG totales encontrada en el grupo inmunizado con el antígeno AndesVac adyuvado con AIF. En tanto, los grupos inmunizados con los antígenos recombinantes Gns-Gcs fueron aquellos que presentaron mayores títulos de anticuerpos IgG totales, con un título promedio de  $1/9.200$  ( $13.17 \pm 1,27 \text{ Log}_2$ ) para el grupo en que se empleó como adyuvante AIF y un título promedio de  $1/7.300$  ( $12.84 \pm 1,29 \text{ Log}_2$ ) para el grupo en que se empleó como adyuvante Alhydrogel, ambos el día 63 post-inmunización, cuando fue tomada la última muestra desde los animales. De esta forma, ambos grupos presentaron títulos similares de anticuerpos IgG totales. Estos resultados son interesantes para un candidato vacunal, teniendo en consideración además que Alhydrogel es un adyuvante cuyo uso está permitido en seres humanos (Mbow et al., 2010). Debido a esto, los ensayos posteriores se realizaron sólo con las muestras de el grupo inmunizado con los antígenos Gns-Gcs formulados con Alhydrogel como adyuvante.

Para los ensayos de determinación del título de anticuerpos neutralizantes, se emplearon viriones seudotipados con las glicoproteínas de superficie, Gn y Gc, de virus Andes. Se determinó un título de anticuerpos neutralizantes promedio en torno a los  $1/1.300$  ( $10.39 \text{ Log}_2$ ) hacia el final del experimento. Estos títulos son similares a los títulos más altos encontrados en la evaluación del desarrollo de anticuerpos neutralizantes en hámsteres sirios empleando otros candidatos vacunales en investigación (Brown et al., 2011). La importancia de este tipo de anticuerpos radica en su capacidad de neutralizar el virus. Serían estos anticuerpos los que permitirían, en aquellas personas vacunadas, que una vez que se vean expuesta al virus no desarrollen la enfermedad. Distintos experimentos, incluyendo ensayos de desafío en hámsteres sirios, han demostrado que estos anticuerpos son suficientes y necesarios para impedir la infección viral y el desarrollo de SCPH (Hooper et al., 2001, 2008; Hooper et al., 2006; Klingström et al., 2008; Maes et al., 2009; Vial et al., 2015; Xu et al., 2002). Cabe destacar que en otros candidatos vacunales desarrollados y reportados en literatura, por ejemplo una vacuna de ADN basada en las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes desarrollada por el Ejército de los Estados Unidos, no fue posible obtener anticuerpos neutralizantes en los hámsteres inmunizados (Custer et al., 2003).

En cuanto a la evaluación de la respuesta inmune celular, se evaluaron las expresiones relativas de IFN $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-6. Se evaluaron estas citoquinas debido a que son las principales involucradas en un perfil de respuesta de inmune de tipo T ayudadora, permitiendo diferenciar un perfil Th1 o Th2 (Dienz & Rincon, 2009; O'Garra, 1998; O'Garra & Arai, 2000; Sieling et al., 1994; Zivcec et al., 2011b). En este ensayo, se observó una elevación significativa de los niveles relativos de ARNm de las citoquinas IFN $\gamma$ , IL-12 e IL-6. La elevación significativa en los niveles relativos de ARNm de IFN $\gamma$  e IL-12 sugiere una perfil de respuesta de tipo Th1, mientras que la elevación de IL-6 resulta difícil de interpretar debido a las funciones pleiotrópicas de esta citoquina.

Aún así, debido al corto tiempo en que los linfocitos fueron analizados y la escasa cantidad de citoquinas analizadas, estos resultados son sólo sugestivos. Se deben realizar más análisis a futuro para complementar esta información y caracterizar en detalle la respuesta inmune inducida por este candidato vacunal. Sería interesante hacer un análisis más detallado de las citoquinas involucradas a distintos tiempos post-estimulación, así como estudiar otras posibles reacciones inmunitarias que pudiesen activarse (activación de linfocitos T citotóxicos y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, por ejemplo).

Los ensayos de respuesta inmune realizados hasta el momento, si bien constituyen un primer paso y se muestran alentadores, son limitados y requieren de más evaluaciones en el futuro. Es necesario caracterizar en mayor profundidad la respuesta inmune celular originada por el candidato vacunal. Adicionalmente, sería interesante evaluar las mejoras que podrían presentarse al utilizar otros adyuvantes, como por ejemplo la presencia de inmunopotenciadores (Kim & Jang, 2017; McElrath, 2017). También es necesario determinar otros factores críticos, como la evaluación de la mejor vía de administración (Zhang et al., 2015), evaluación a largo plazo de la inmunidad generada y evaluar la efectividad de la vacuna frente a ensayos de desafío con virus Andes.

Los resultados obtenidos hasta este punto sirvieron de base para presentar una solicitud de patente nacional con fecha de prioridad en agosto del 2018. Esta patente también fue recientemente solicitada en Argentina, Uruguay, Bolivia y en el PCT (agosto de 2019).

Teniendo en cuenta todo lo mencionado anteriormente, estimamos que el candidato vacunal consistente en los antígenos Gns-Gcs adyuvados en Alhydrogel es un prototipo de vacuna altamente prometedor. Sin embargo, para alcanzar el mercado, aun queda un importante conjunto de actividades que se deben desarrollar. Entre ellas destaca el establecer el proceso de producción a escala piloto, en salas blancas, en condiciones de buenas prácticas de manufactura (*Good Manufacturing Practices*, GMP). Actualmente estamos realizando en esto en la Unidad de Prototipado y Escalamiento (UPE) de INN BIO (Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción). Así, trabajamos en demostrar la reproducibilidad del proceso a escala piloto, y en elaborar los Procedimientos Normalizados de Operación (PNO) para cada una de sus etapas. Además, un ensayo preclínico fundamental para demostrar la efectividad del candidato vacunal de proteger contra el desarrollo de SCPH consiste en la realización un ensayo de inmunización y desafío en un laboratorio BSL-4. Este ensayo se realizará en los laboratorios BSL-4 del U.S. Army Medical Research Institute of Infectious Diseases (USAMRIID), en colaboración con el Dr. Jay W. Hooper. Inicialmente, nuestra intención era realizar estos ensayos en el contexto de la presente tesis. Sin embargo, el laboratorio mencionado se encuentra realizando reformas estructurales importantes que impiden su empleo en el mediano plazo. Adicionalmente, consideramos relevante realizar estos ensayos con el candidato vacunal producido bajo condiciones GMP. De esta forma, los resultados que deriven de estos experimentos podrán servir de base para el registro sanitario del producto ante el ISP.

## RECAPITULACIÓN

- Es posible expresar antígenos basados en los ectodominios de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en cultivos de células de mamíferos transducidos con vectores adenovirales conteniendo las secuencias codificantes para dichas proteínas. Los niveles de expresión de los ectodominios sGn y sGc son directamente proporcionales a la multiplicidad de infección empleada en el proceso de transducción. Sin embargo, estos niveles de expresión son entre 5 y 10 veces inferiores a los reportados para otras moléculas producidas mediante transducción adenoviral. Esto constituye una limitante en el uso de estos antígenos para la formulación de un candidato vacunal contra SCPH.
- Es posible expresar antígenos basados en los ectodominios de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes en levaduras transformadas conteniendo las secuencias codificantes para dichas proteínas. El antígeno Gns es secretado al medio de inducción, donde se encuentra formando estructuras de amplios pesos moleculares. Al ser co-expresados los antígenos Gns y Gcs, ambos son retenidos en el interior de las levaduras. Los antígenos Gns y Gcs parecen formar agregados de alto peso molecular y altamente estables. Ambos antígenos pueden ser purificados con una pureza superior al 95% luego de un único paso de IMAC. El replegamiento de los antígenos puros logra la re-obtención de complejos de alto peso molecular en condiciones no reductoras, lo que sugiere un correcto plegamiento de los antígenos. El proceso para la obtención del complejo antigénico Gns-Gcs es escalable.
- Se diseñó un antígeno recombinante basado en epítopes lineales presentes en las proteínas Gn, Gc y N de virus Andes. Este antígeno, denominado AndesVac, es expresado de manera insoluble en bacterias. El antígeno solubilizado puede ser purificado con una pureza superior al 95% luego de un único paso de IMAC. El proceso para la obtención de AndesVac es escalable.



- La inmunización de hámsteres sirios con los antígenos recombinantes, tanto con el complejo antigénico Gns-Gcs como con AndesVac, es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos IgG totales significativa. La formulación capaz de generar mejores títulos de anticuerpos IgG totales consiste en el complejo antigénico Gns-Gcs adyuvado con Alhydrogel. Este candidato vacunal además genera un título significativo de anticuerpos neutralizantes, y una elevación significativa de los niveles relativos de ARNm de las citoquinas IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-6.
- El candidato vacunal consistente en los antígenos Gns-Gcs adyuvados en Alhydrogel tiene el potencial convertirse en la primera vacuna comercializable contra SCPH.



## CONCLUSIÓN

Antígenos derivados de las glicoproteínas de superficie del virus Andes, producidos por vías recombinantes, son capaces de inducir una respuesta inmune específica contra virus Andes en hámsteres sirios.

Los antígenos recombinantes corresponden a las regiones expuestas de las glicoproteínas Gn y Gc de virus Andes. La co-expresión de los antígenos fue realizada en la levadura metilotrófica *Pichia pastoris*, mediante inducción con metanol. Se logró una purificación de los antígenos con una pureza en torno al 98%, y una producción estimada en 2 gramos de antígenos por litro de fermentación. Los antígenos formulados con hidróxido de aluminio como adyuvante (Alhydrogel) generaron una respuesta inmune específica contra virus Andes en hámsteres sirios inmunizados. La respuesta generada se caracterizó por elevación significativa de los títulos de anticuerpos IgG totales (1 en 7.300) y neutralizantes (1 en 1.300). El título de anticuerpos neutralizantes sugiere que la respuesta inmune inducida podría ser capaz de impedir la infección viral, y de esta forma el desarrollo de SCPH en hámsteres sirios, lo cual debe ser confirmado a través de ensayos de desafío. Además, se observó un aumento de los niveles relativos de ARNm de las citoquinas IL-6, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Este perfil de citoquinas sugiere una polarización de la respuesta inmune de tipo Th1. Esto resulta interesante, teniendo en consideración que en general una respuesta inmune de tipo Th1 es característica contra patógenos intracelulares, como lo son los virus.

## REFERENCIAS

- Acuna, R., Cifuentes-Munoz, N., Marquez, C. L., Bulling, M., Klingstrom, J., Mancini, R., Lozach, P.-Y., & Tischler, N. D. (2014). Hantavirus Gn and Gc Glycoproteins Self-Assemble into Virus-Like Particles. *Journal of Virology*, *88*(4), 2344–2348. <https://doi.org/10.1128/jvi.03118-13>
- Andersen, D. C., & Krummen, L. (2002). Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Current Opinion in Biotechnology*, *13*(2), 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00300-2](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00300-2)
- Arikawa, J., Schmaljohn, A. L., Dalrymple, J. M., & Schmaljohn, C. S. (1989). Characterization of Hantaan virus envelope glycoprotein antigenic determinants defined by monoclonal antibodies. *Journal of General Virology*, *70* ( Pt 3)(3), 615–624. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-70-3-615>
- Avšič Županc, T., & Korva, M. (2014). Hantavirus Infections. In *Emerging Infectious Diseases* (Vol. 22, pp. 25–36). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416975-3.00003-0>
- Battisti, A. J., Chu, Y.-K., Chipman, P. R., Kaufmann, B., Jonsson, C. B., & Rossmann, M. G. (2011). Structural Studies of Hantaan Virus. *Journal of Virology*, *85*(2), 835–841. <https://doi.org/10.1128/JVI.01847-10>
- Beltrán-Ortiz, C. E., Starck-Mendez, M. F., Fernández, Y., Farnós, O., González, E. E., Rivas, C. I., Camacho, F., Zuñiga, F. A., Toledo, J. R., & Sánchez, O. (2017). Expression and purification of the surface proteins from Andes virus. *Protein Expression and Purification*, *139*, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2015.09.013>
- Bharadwaj, M., Nofchissey, R., Goade, D., Koster, F., & Hjelle, B. (2000). Humoral Immune Responses in the Hantavirus Cardiopulmonary Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, *182*(1), 43–48. <https://doi.org/10.1086/315657>
- Bi, Z., Formenty, P. B. H., & Roth, C. E. (2008). Review Article Hantavirus Infection : a review and global update. *Journal of Infection in Developing Countries*, *2*(1), 21–23.
- Bignon, E. A., Albornoz, A., Calvo, P. G., Rey, F. A., & Tischler, N. D. (2019). Molecular organization and dynamics of the fusion protein Gc at the hantavirus surface. *ELife*, *8*, 1–24. <https://doi.org/10.7554/eLife.46028>
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, *7*(6), 1513–1523. [papers3://publication/uuid/05D83615-9F40-468B-80E2-EA1F0D2CA434](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10162987/)

- Borges, A. A., Campos, G. M., Moreli, M. L., Souza, R. L. M., Aquino, V. H., Saggiaro, F. P., & Figueiredo, L. T. M. (2006). Hantavirus cardiopulmonary syndrome: immune response and pathogenesis. *Microbes and Infection*, 8(8), 2324–2330. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.04.019>
- Brocato, R., Josleyn, M., Ballantyne, J., Vial, P., & Hooper, J. W. (2012). DNA vaccine-generated duck polyclonal antibodies as a postexposure prophylactic to prevent hantavirus pulmonary syndrome (HPS). *PLoS ONE*, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035996>
- Brocato, R. L., & Hooper, J. W. (2019). Progress on the prevention and treatment of hantavirus disease. *Viruses*, 11(7), 1–14. <https://doi.org/10.3390/v11070610>
- Brown, K. S., Safronetz, D., Marzi, A., Ebihara, H., & Feldmann, H. (2011). Vesicular Stomatitis Virus-Based Vaccine Protects Hamsters against Lethal Challenge with Andes Virus. *Journal of Virology*, 85(23), 12781–12791. <https://doi.org/10.1128/jvi.00794-11>
- Burgess, R. R. (2009). Chapter 17 Refolding Solubilized Inclusion Body Proteins. In *Methods in Enzymology* (1st ed., Vol. 463, Issue C). Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)63017-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)63017-2)
- Cabrita, L. D., & Bottomley, S. P. (2004). Protein expression and refolding - A practical guide to getting the most out of inclusion bodies. *Biotechnology Annual Review*, 10(SPEC. ISS.), 31–50. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(04\)10002-1](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(04)10002-1)
- Castillo H., C., & Ossa A., G. (2002). Síndrome pulmonar por hantavirus Andes en Chile. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias*, 18(1), 35–46. <https://doi.org/10.4067/S0717-73482002000100005>
- Chan, M. Y., Dowling, Q. M., Sivananthan, S. J., & Kramer, R. M. (2017). Vaccine Adjuvants. In C. B. Fox (Ed.), *Vaccine Adjuvants: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology* (Vol. 1494). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1>
- Chang, J. C. C., Diveley, J. P., Savary, J. R., & Jensen, F. C. (1998). Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32(3), 173–186. [https://doi.org/10.1016/S0169-409X\(98\)00009-X](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00009-X)
- Chhetri, G., Kalita, P., & Tripathi, T. (2015). An efficient protocol to enhance recombinant protein expression using ethanol in Escherichia coli. *MethodsX*, 2, 385–391. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2015.09.005>
- Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., & Tischler, N. (2014). Hantavirus Gn and Gc

- Envelope Glycoproteins: Key Structural Units for Virus Cell Entry and Virus Assembly. *Viruses*, 6(4), 1801–1822. <https://doi.org/10.3390/v6041801>
- Cordeiro, A. S., & Alonso, M. J. (2016). Recent advances in vaccine delivery. *Pharmaceutical Patent Analyst*, 5(1), 49–73. <https://doi.org/10.4155/ppa.15.38>
- Custer, D. M., Thompson, E., Schmaljohn, C. S., Ksiazek, T. G., & Hooper, J. W. (2003). Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine. *Journal of Virology*, 77(18), 9894–9905. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9894>
- De Carvalho Nicacio, C., Gonzalez Della Valle, M., Padula, P., Björling, E., Plyusnin, A., & Lundkvist, Å. (2002). Cross-Protection against Challenge with Puumala Virus after Immunization with Nucleocapsid Proteins from Different Hantaviruses Cross-Protection against Challenge with Puumala Virus after Immunization with Nucleocapsid Proteins from Different Hantaviruses. *Journal of Virology*, 76(13), 6669–6677. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.13.6669>
- Del Giudice, G., Rappuoli, R., & Didierlaurent, A. M. (2018). Correlates of adjuvanticity: A review on adjuvants in licensed vaccines. *Seminars in Immunology*, 39(May), 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.05.001>
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Production of Recombinant Proteins by Microbes and Higher Organisms. *Comprehensive Biotechnology, Second Edition*, 3(3), 333–345. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00542-0>
- Deyde, V. M., Rizvanov, A. A., Chase, J., Otteson, E. W., & St. Jeor, S. C. (2005). Interactions and trafficking of Andes and Sin Nombre Hantavirus glycoproteins G1 and G2. *Virology*, 331(2), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.11.003>
- Dienz, O., & Rincon, M. (2009). The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical Immunology*, 130(1), 27–33. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.08.018>
- Dorner, B. G., Dorner, M. B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H. W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R. S., Henn, V., & Kroczeck, R. A. (2009). Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8+ T Cells. *Immunity*, 31(5), 823–833. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.08.027>
- Duckert, P., Brunak, S., & Blom, N. (2004). Prediction of proprotein convertase cleavage sites. *Protein Engineering, Design and Selection*, 17(1), 107–112. <https://doi.org/10.1093/protein/gzh013>
- EL-Manzalawy, Y., Dobbs, D., & Honavar, V. (2008). Predicting linear B-cell epitopes

- using string kernels. *Journal of Molecular Recognition*, 21(4), 243–255.  
<https://doi.org/10.1002/jmr.893>
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871–874.  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5135623>
- Ennis, F. a, Cruz, J., Spiropoulou, C. F., Waite, D., Peters, C. J., Nichol, S. T., Kariwa, H., & Koster, F. T. (1997). Hantavirus pulmonary syndrome: CD8+ and CD4+ cytotoxic T lymphocytes to epitopes on Sin Nombre virus nucleocapsid protein isolated during acute illness. *Virology*, 238(2), 380–390. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8827>
- Enria, D. a, Briggiler, a. M., Pini, N., & Levis, S. (2001). Clinical manifestations of New World hantaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 256, 117–134.  
[https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7\\_7](https://doi.org/10.1007/978-3-642-56753-7_7)
- Eskandari, S., Guerin, T., Toth, I., & Stephenson, R. J. (2017). Recent advances in self-assembled peptides: Implications for targeted drug delivery and vaccine engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 110–111, 169–187.  
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.06.013>
- Fahnert, B., Lillie, H., & Neubauer, P. (2012). *Inclusion Bodies: Formation and Utilisation*. February, 93–142. <https://doi.org/10.1007/b93995>
- Fernández-García, Y., Reguera, J., Busch, C., Witte, G., Sánchez-Ramos, O., Betzel, C., Cusack, S., Günther, S., & Reindl, S. (2016). Atomic Structure and Biochemical Characterization of an RNA Endonuclease in the N Terminus of Andes Virus L Protein. *PLoS Pathogens*, 12(6), 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005635>
- Flick, K., Hooper, J. W., Schmaljohn, C. S., Pettersson, R. F., Feldmann, H., & Flick, R. (2003). Rescue of Hantaan virus minigenomes. *Virology*, 306(2), 219–224.  
[https://doi.org/10.1016/S0042-6822\(02\)00070-3](https://doi.org/10.1016/S0042-6822(02)00070-3)
- Frey, S., Castro, A., Arsiwala, A., & Kane, R. S. (2018). Bionanotechnology for vaccine design. *Current Opinion in Biotechnology*, 52, 80–88.  
<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.03.003>
- Galeno, H., Mora, J., Villagra, E., Fernandez, J., Hernandez, J., Mertz, G. J., & Ramirez, E. (2002). First human isolate of hantavirus (Andes virus) in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*, 8(7), 657–661. <https://doi.org/10.3201/eid0807.010277>
- Garrido, J. L., Presscott, J., Calvo, M., Bravo, F., Alvarez, R., Salas, A., Riquelme, R., Rioseco, M. L., Williamson, B. N., Haddock, E., Feldmann, H., & Barria, M. I. (2018). Two recombinant human monoclonal antibodies that protect against lethal Andes

- hantavirus infection in vivo. *Science Translational Medicine*, 10(468), 1–12. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat6420>
- Gavrilovskaya, I. N., Brown, E. J., Ginsberg, M. H., & Mackow, E. R. (1999). Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *Journal of Virology*, 73(5), 3951–3959. <https://doi.org/10.1128/JVI.73.5.3951-3959>
- Gavrilovskaya, I. N., Peresleni, T., Geimonen, E., & Mackow, E. R. (2002). Pathogenic hantaviruses selectively inhibit beta3 integrin directed endothelial cell migration. *Archives of Virology*, 147(10), 1913–1931. <https://doi.org/10.1007/s00705-002-0852-0>
- Gavrilovskaya, I. N., Shepley, M., Shaw, R., Ginsberg, M. H., & Mackow, E. R. (1998). beta3 Integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(12), 7074–7079. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.12.7074>
- Georgiou, G., & Valax, P. (1996). Expression of correctly folded proteins in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(2), 190–197. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8791338>
- Gerrard, S. R., & Nichol, S. T. (2002). Characterization of the Golgi Retention Motif of Rift Valley Fever Virus GN Glycoprotein. *Journal of Virology*, 76(23), 12200–12210. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.23.12200-12210.2002>
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of General Virology*, 36(1), 59–74. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-36-1-59>
- Gupta, R., & Brunak, S. (2002). Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. *Pacific Symposium on Biocomputing*, 310–322. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11928486>
- Haese, N., Brocato, R. L., Henderson, T., Nilles, M. L., Kwilas, S. A., Josleyn, M. D., Hammerbeck, C. D., Schiltz, J., Royals, M., Ballantyne, J., Hooper, J. W., & Bradley, D. S. (2015). Antiviral biologic produced in DNA vaccine/ goose platform protects hamsters against hantavirus pulmonary syndrome when administered post-exposure. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003803>
- He, T.-C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2509–2514. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2509>

<https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.2509>

- Heinemann, P., Schmidt-Chanasit, J., & Gunther, S. (2013). The N Terminus of Andes Virus L Protein Suppresses mRNA and Protein Expression in Mammalian Cells. *Journal of Virology*, 87(12), 6975–6985. <https://doi.org/10.1128/JVI.00043-13>
- Heiskanen, T., Lundkvist, A., Soliymani, R., Koivunen, E., Vaheri, A., & Lankinen, H. (1999). Phage-displayed peptides mimicking the discontinuous neutralization sites of puumala Hantavirus envelope glycoproteins. *Virology*, 262(2), 321–332. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.9930>
- Hemmerich, J., Freier, L., Wiechert, W., von Lieres, E., & Oldiges, M. (2017). Generic Protocol for Optimization of Heterologous Protein Production Using Automated Microbioreactor Technology. *Journal of Visualized Experiments*, 130, 1–13. <https://doi.org/10.3791/56234>
- Hepojoki, J., Strandin, T., Vaheri, A., & Lankinen, H. (2010). Interactions and Oligomerization of Hantavirus Glycoproteins. *Journal of Virology*, 84(1), 227–242. <https://doi.org/10.1128/JVI.00481-09>
- Hepojoki, Jussi, Strandin, T., Lankinen, H., & Vaheri, A. (2012a). Hantavirus structure - Molecular interactions behind the scene. *Journal of General Virology*, 93(8), 1631–1644. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042218-0>
- Hepojoki, Jussi, Strandin, T., Lankinen, H., & Vaheri, A. (2012b). Hantavirus structure – molecular interactions behind the scene. *Journal of General Virology*, 93(8), 1631–1644. <https://doi.org/10.1099/vir.0.042218-0>
- Hickling, J. K., Jones, K. R., Friede, M., Zehrung, D., Chen, D., & Kristensenc, D. (2011). Intradermal delivery of vaccines: Potential benefits and current challenges. *Bulletin of the World Health Organization*, 89(3), 221–226. <https://doi.org/10.2471/BLT.10.079426>
- Hilleman, M. R. (1987). Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection*, 15(1), 3–7. <https://doi.org/10.1007/BF01646107>
- Hjelle, B. (2002). Vaccines against hantaviruses. *Expert Review of Vaccines*, 1(3), 373–384. <https://doi.org/10.1586/14760584.1.3.373>
- Hjelle, B., Chavez-Giles, F., Torrez-Martinez, N., Yamada, T., Sarisky, J., Ascher, M., & Jenison, S. (1994). Dominant glycoprotein epitope of four corners hantavirus is conserved across a wide geographical area. *The Journal of General Virology*, 75, 2881–2888. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-75-11-2881>
- HogenEsch, H. (2012). Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum



- adjuvants. *Frontiers in Immunology*, 3(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00406>
- Hooper, J. W., Brocato, R. L., Bell, T. M., Queen, L. A., Hammerbeck, C. D., & Wells, J. B. (2013). A Lethal Disease Model for Hantavirus Pulmonary Syndrome in Immunosuppressed Syrian Hamsters Infected with Sin Nombre Virus. *Journal of Virology*, 88(2), 811–819. <https://doi.org/10.1128/jvi.02906-13>
- Hooper, J. W., Custer, D. M., Thompson, E., & Schmaljohn, C. S. (2002). DNA Vaccination with the Hantaan Virus M Gene Protects Hamsters against Three of Four HFRS Hantaviruses and Elicits a High-Titer Neutralizing Antibody Response in Rhesus Monkeys. *Journal of Virology*, 75(18), 8469–8477. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.18.8469-8477.2001>
- Hooper, J. W., Ferro, A. M., & Wahl-Jensen, V. (2008). Immune Serum Produced by DNA Vaccination Protects Hamsters against Lethal Respiratory Challenge with Andes Virus. *Journal of Virology*, 82(3), 1332–1338. <https://doi.org/10.1128/JVI.01822-07>
- Hooper, J. W., Larsen, T., Custer, D. M., & Schmaljohn, C. S. (2001). A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome. *Virology*. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1133>
- Hooper, Jay W., Custer, D. M., Smith, J., & Wahl-Jensen, V. (2006). Hantaan/Andes virus DNA vaccine elicits a broadly cross-reactive neutralizing antibody response in nonhuman primates. *Virology*, 347(1), 208–216. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.035>
- Hooper, Jay W., Josleyn, M., Ballantyne, J., & Brocato, R. (2013). A novel Sin Nombre virus DNA vaccine and its inclusion in a candidate pan-hantavirus vaccine against hantavirus pulmonary syndrome (HPS) and hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). *Vaccine*, 31(40), 4314–4321. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.07.025>
- Hussein, I. T. M., & Mir, M. A. (2013). How hantaviruses modulate cellular pathways for efficient replication? *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)*, 5, 154–166. <https://doi.org/10.2741/E604>
- Iavarone, C., O'hagan, D. T., Yu, D., Delahaye, N. F., & Ulmer, J. B. (2017). Mechanism of action of mRNA-based vaccines. *Expert Review of Vaccines*, 16(9), 871–881. <https://doi.org/10.1080/14760584.2017.1355245>
- Jiang, H., Du, H., Wang, L. M., Wang, P. Z., & Bai, X. F. (2016). Hemorrhagic fever with renal syndrome: Pathogenesis and clinical picture. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6(FEB), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00001>

- Jiang, H., Zheng, X., Wang, L., Du, H., Wang, P., & Bai, X. (2017). Hantavirus infection: a global zoonotic challenge. *Virologica Sinica*, 32(1), 32–43. <https://doi.org/10.1007/s12250-016-3899-x>
- Jiao, J. -a., Kwilas, S. A., Sullivan, E. J., Hooper, J. W., Hammerbeck, C. D., Royals, M., Wu, H., Ballantyne, J., Matsushita, H., Brocato, R. L., & Josleyn, M. D. (2014). DNA vaccine-derived human IgG produced in transchromosomal bovines protect in lethal models of hantavirus pulmonary syndrome. *Science Translational Medicine*, 6(264), 264ra162-264ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010082>
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., & Vapalahti, O. (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 412–441. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
- Jonsson, C. B., Hooper, J., & Mertz, G. (2008). Treatment of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Research*, 78(1), 162–169. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2007.10.012>
- Kelner, G. S., Kennedy, J., Bacon, K. B., Kleyensteuber, S., Largaespada, D. A., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., Bazan, J. F., Moore, K. W., & Schall, T. J. (1994). Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5189), 1395–1399. <https://doi.org/10.1126/science.7973732>
- Kennedy, J., Kelner, G. S., Kleyensteuber, S., Schall, T. J., Weiss, M. C., Yssel, H., Schneider, P. V., Cocks, B. G., Bacon, K. B., & Zlotnik, A. (1995). Molecular cloning and functional characterization of human lymphotoxin. *Journal of Immunology*, 155(1), 203–209. [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7602097](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7602097)
- Kim, S. H., & Jang, Y. S. (2017). The development of mucosal vaccines for both mucosal and systemic immune induction and the roles played by adjuvants. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 6(1), 15–21. <https://doi.org/10.7774/cevr.2017.6.1.15>
- Klingström, J., Stoltz, M., Hardestam, J., Ahlm, C., & Lundkvist, Å. (2008). Passive immunization protects cynomolgus macaques against Puumala hantavirus challenge. *Antiviral Therapy*, 13(1), 125–133.
- Knudsen, N. P. H., Olsen, A., Buonsanti, C., Follmann, F., Zhang, Y., Coler, R. N., Fox, C. B., Meinke, A., Dóro, U., Casini, D., Bonci, A., Billeskov, R., De Gregorio, E., Rappuoli, R., Harandi, A. M., Andersen, P., & Agger, E. M. (2016). Different human

- vaccine adjuvants promote distinct antigen-independent immunological signatures tailored to different pathogens. *Scientific Reports*, 6(October 2015), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep19570>
- Koff, W. C., Burton, D. R., Johnson, P. R., Walker, B. D., King, C. R., Nabel, G. J., Ahmed, R., Bhan, M. K., & Plotkin, S. A. (2013). Accelerating Next-Generation Vaccine Development for Global Disease Prevention. *Science*, 340(6136), 1232910–1232910. <https://doi.org/10.1126/science.1232910>
- Kruger, D. H., Figueiredo, L. T. M., Song, J. W., & Klempa, B. (2015). Hantaviruses—Globally emerging pathogens. *Journal of Clinical Virology*, 64, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>
- Krüger, D. H., Schönrich, G., & Klempa, B. (2011). Human pathogenic hantaviruses and prevention of infection. *Human Vaccines*, 7(6), 685–693. <https://doi.org/10.4161/hv.7.6.15197>
- Krüger, D. H., Ulrich, R., & Lundkvist, Å. (2001). Hantavirus infections and their prevention. *Microbes and Infection*, 3(13), 1129–1144. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(01\)01474-5](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(01)01474-5)
- Kukkonen, S. K. J., Vaheri, A., & Plyusnin, A. (2005). L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. *Archives of Virology*, 150(3), 533–556. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0414-8>
- Kukkonen, Sami K.J., Vaheri, A., & Plyusnin, A. (2004). Tula hantavirus L protein is a 250 kDa perinuclear membrane-associated protein. *Journal of General Virology*, 85(5), 1181–1189. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19748-0>
- Lambricht, L., Peres, C., Florindo, H., Pr at, V., & Vandermeulen, G. (2017). Polymer-Based Nanoparticles as Modern Vaccine Delivery Systems. In *Micro- and Nanotechnology in Vaccine Development*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-39981-4.00010-5>
- Larke, B., Strong, J. E., Jones, S. E., Drebot, M., Grolla, A., & Poliquin, P. G. (2015). Therapeutic Approaches for New World Hantaviruses. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, 7(3), 230–239. <https://doi.org/10.1007/s40506-015-0047-3>
- Laurichesse, H., Gourdon, F., Smits, H. L., Abdoe, T. H., Estavoyer, J. M., Rebika, H., Poulouen, P., Catalina, P., Dubray, C., & Beytout, J. (2007). Safety and immunogenicity of subcutaneous or intramuscular administration of a monovalent inactivated vaccine against *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae in healthy volunteers. *Clinical Microbiology and Infection*, 13(4), 395–403.

<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01662.x>

- Leclerc, C. (2003). New approaches in vaccine development. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 26(5–6), 329–341. [https://doi.org/10.1016/S0147-9571\(03\)00018-3](https://doi.org/10.1016/S0147-9571(03)00018-3)
- Lee, B. H., Yoshimatsu, K., Araki, K., Okumura, M., Nakamura, I., & Arikawa, J. (2006). A pseudotype vesicular stomatitis virus containing Hantaan virus envelope glycoproteins G1 and G2 as an alternative to hantavirus vaccine in mice. *Vaccine*, 24(15), 2928–2934. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.12.040>
- Lee, S. Y. (1996). High cell-density culture of Escherichia coli. *Trends in Biotechnology*, 14(3), 98–105. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(96\)80930-9](https://doi.org/10.1016/0167-7799(96)80930-9)
- Lei, Y., & Takahama, Y. (2012). XCL1 and XCR1 in the immune system. *Microbes and Infection*, 14(3), 262–267. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.10.003>
- Levanov, L., Iheozor-Ejiofor, R. P., Lundkvist, Å., Vapalahti, O., & Plyusnin, A. (2019). Defining of MAbs-neutralizing sites on the surface glycoproteins Gn and Gc of a hantavirus using vesicular stomatitis virus pseudotypes and site-directed mutagenesis. *Journal of General Virology*, 100(2), 145–155. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001202>
- Levine, M. M., & Sztein, M. B. (2004). Vaccine development strategies for improving immunization: The role of modern immunology. *Nature Immunology*, 5(5), 460–464. <https://doi.org/10.1038/ni0504-460>
- Li, S., Rissanen, I., Zeltina, A., Hepojoki, J., Raghvani, J., Harlos, K., Pybus, O. G., Huiskonen, J. T., & Bowden, T. A. (2016). A Molecular-Level Account of the Antigenic Hantaviral Surface. *Cell Reports*, 15(5), 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.03.082>
- Li, W., Cowley, A., Uludag, M., Gur, T., McWilliam, H., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., & Lopez, R. (2015). The EMBL-EBI bioinformatics web and programmatic tools framework. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W580–4. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv279>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Löber, C., Anheier, B., Lindow, S., Klenk, H. D., & Feldmann, H. (2001). The Hantaan virus glycoprotein precursor is cleaved at the conserved pentapeptide WAASA. *Virology*, 289(2), 224–229. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1171>

- Luo, J., Deng, Z. L., Luo, X., Tang, N., Song, W. X., Chen, J., Sharff, K. A., Luu, H. H., Haydon, R. C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & He, T. C. (2007). A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nature Protocols*, 2(5), 1236–1247. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.135>
- MacNeil, A., Nichol, S. T., & Spiropoulou, C. F. (2011). Hantavirus pulmonary syndrome. *Virus Research*, 162(1–2), 138–147. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.09.017>
- Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., Briese, T., Buchmeier, M. J., Calisher, C. H., Charrel, R. N., Choi, I. R., Clegg, C. S., de la Torre, J. C., Delwart, E., DeRisi, J. L., Di Bello, P. L., Di Serio, F., Digiaro, M., Dolja, V. V., Drosten, C., ... Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyvirales: update 2018. *Archives of Virology*, 163(8), 2295–2310. <https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>
- Maes, P., Clement, J., & Van Ranst, M. (2009). Recent approaches in hantavirus vaccine development. *Expert Review of Vaccines*, 8(1), 67–76. <https://doi.org/10.1586/14760584.8.1.67>
- Manigold, T., & Vial, P. (2014). Human hantavirus infections: Epidemiology, clinical features, pathogenesis and immunology. *Swiss Medical Weekly*, 144(March), 1–10. <https://doi.org/10.4414/smw.2014.13937>
- Marrack, P., Mckee, A. S., & Munks, M. W. (2009). *Towards an outstanding of the adjuvant action of aluminium.pdf*. 9(Aprill), 287–293.
- Martinez, Valeria P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., & Padula, P. J. (2005). Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1848–1853. <https://doi.org/10.3201/eid1112.050501>
- Martinez, Valeria Paula, & Padula, P. J. (2012). Induction of protective immunity in a syrian hamster model against a cytopathogenic strain of andes virus. *Journal of Medical Virology*, 84(1), 87–95. <https://doi.org/10.1002/jmv.22228>
- Matsuoka, Y., Chen, S. Y., & Compans, R. W. (1994). A signal for Golgi retention in the bunyavirus G1 glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry*, 269(36), 22565–22573.
- Matthys, V. S., Gorbunova, E. E., Gavrillovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2010). Andes Virus Recognition of Human and Syrian Hamster 3 Integrins Is Determined by an L33P Substitution in the PSI Domain. *Journal of Virology*, 84(1), 352–360. <https://doi.org/10.1128/JVI.01013-09>
- Mbow, M. L., De Gregorio, E., & Ulmer, J. B. (2011). Alum's adjuvant action: Grease is the word. *Nature Medicine*, 17(4), 415–416. <https://doi.org/10.1038/nm0411-415>

- Mbow, M. L., De Gregorio, E., Valiante, N. M., & Rappuoli, R. (2010). New adjuvants for human vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 22(3), 411–416. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.04.004>
- Mccaughey, C., & Hart, C. A. A. (2000). *Hantaviruses*. 49.
- McElrath, M. J. (2017). Adjuvants: Tailoring humoral immune responses. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 12(3), 278–284. <https://doi.org/10.1097/COH.0000000000000365>
- McWilliam, H., Li, W., Uludag, M., Squizzato, S., Park, Y. M., Buso, N., Cowley, A. P., & Lopez, R. (2013). Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue), W597-600. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>
- Medina, R. A., Torres-Perez, F., Galeno, H., Navarrete, M., Vial, P. A., Palma, R. E., Ferres, M., Cook, J. A., & Hjelle, B. (2009). Ecology, Genetic Diversity, and Phylogeographic Structure of Andes Virus in Humans and Rodents in Chile. *Journal of Virology*, 83(6), 2446–2459. <https://doi.org/10.1128/JVI.01057-08>
- Miao, J., Chard, L. S., Wang, Z., & Wang, Y. (2019). Syrian Hamster as an Animal Model for the Study on Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology*, 10(October), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02329>
- Milazzo, M. L., Eyzaguirre, E. J., Molina, C. P., & Fulhorst, C. F. (2002). Maporal Viral Infection in the Syrian Golden Hamster: A Model of Hantavirus Pulmonary Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*, 186(10), 1390–1395. <https://doi.org/10.1086/344735>
- Mir, M. a, & Panganiban, a T. (2004). Trimeric Hantavirus Nucleocapsid Protein Binds Specifically to the Viral RNA Panhandle Trimeric Hantavirus Nucleocapsid Protein Binds Specifically to the Viral RNA Panhandle. *Society*, 78(15), 8281–8288. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.15.8281>
- Misawa, S., & Kumagai, I. (2000). Refolding of Therapeutic Proteins Produced in Escherichia coli as. *Biopolymers*, 51, 297–307.
- Mohanani, D., Slütter, B., Henriksen-Lacey, M., Jiskoot, W., Bouwstra, J. A., Perrie, Y., Kündig, T. M., Gander, B., & Johansen, P. (2010). Administration routes affect the quality of immune responses: A cross-sectional evaluation of particulate antigen-delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 147(3), 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.012>
- Muranyi, W. (2005). Hantavirus Infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(12), 3669–3679. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005050561>
- Nakai, K., & Horton, P. (1999). PSORT: A program for detecting sorting signals in proteins

- and predicting their subcellular localization. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(1), 34–35. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01336-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01336-X)
- Nascimento, I. P., & Leite, L. C. C. (2012). Recombinant vaccines and the development of new vaccine strategies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(12), 1102–1111. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2012007500142>
- O'Garra, A. (1998). Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*, 8(3), 275–283. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80533-6](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80533-6)
- O'Garra, A., & Arai, N. (2000). The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation. *Trends in Cell Biology*, 10(12), 542–550. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(00\)01856-0](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(00)01856-0)
- O'Hagan, D. T., Ott, G. S., Van Nest, G., Rappuoli, R., & Del Giudice, G. (2013). The history of MF59® adjuvant: A phoenix that arose from the ashes. *Expert Review of Vaccines*, 12(1), 13–30. <https://doi.org/10.1586/erv.12.140>
- Oñate, A. A., Wan, Y., & Moreno, A. (2020). Editorial: Molecular Vaccines Against Pathogens in the Post-genomic Era. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9(January), 2019–2021. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00443>
- Pardi, N., Hogan, M. J., Porter, F. W., & Weissman, D. (2018). mRNA vaccines—a new era in vaccinology. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(4), 261–279. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.243>
- Parra, N. C., Mansilla, R., Aedo, G., Vispo, N. S., González-Horta, E. E., González-Chavarría, I., Castillo, C., Camacho, F., & Sánchez, O. (2019). Expression and Characterization of Human Vascular Endothelial Growth Factor Produced in SiHa Cells Transduced with Adenoviral Vector. *Protein Journal*, 38(6), 693–703. <https://doi.org/10.1007/s10930-019-09867-y>
- Patra, A. K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L. C., & Panda, A. K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18(2), 182–192. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1179>
- Petersen, T. N., Brunak, S., von Heijne, G., & Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 8(10), 785–786. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1701>
- Piper, M. E., Sorenson, D. R., & Gerrard, S. R. (2011). Efficient cellular release of rift valley fever virus requires genomic RNA. *PLoS ONE*, 6(3).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018070>

- Plyusnin, A., Vapalahti, O., & Vaheri, A. (1996). Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *The Journal of General Virology*, 77 ( Pt 11(11), 2677–2687. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-77-11-2677>
- Prescott, J., Debuysscher, B. L., Brown, K. S., & Feldmann, H. (2014). Long-term single-dose efficacy of a vesicular Stomatitis virus-based Andes virus vaccine in Syrian hamsters. *Viruses*, 6(2), 516–523. <https://doi.org/10.3390/v6020516>
- Ravkov, E. V., & Compans, R. W. (2001). Hantavirus Nucleocapsid Protein Is Expressed as a Membrane- Associated Protein in the Perinuclear Region. *Journal of Virology*, 75(4), 1808–1815. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.4.1808>
- Reed, S. G., Bertholet, S., Coler, R. N., & Friede, M. (2009). New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*, 30(1), 23–32. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.09.006>
- Reiser, J. (2000). Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Therapy*, 7(11), 910–913. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301188>
- Rissanen, I., Stass, R., Zeltina, A., Li, S., Hepojoki, J., Harlos, K., Gilbert, R. J. C., Huiskonen, J. T., & Bowden, T. A. (2017). Structural Transitions of the Conserved and Metastable Hantaviral Glycoprotein Envelope. *Journal of Virology*, 91(21), 1–11. <https://doi.org/10.1128/JVI.00378-17>
- Rosano, G. L., & Ceccarelli, E. A. (2014). Recombinant protein expression in Escherichia coli: Advances and challenges. *Frontiers in Microbiology*, 5(APR), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00172>
- Ruben, F. L., Froeschle, J. E., Meschievitz, C., Chen, K., George, J., Reeves-Hoche, M. K., Pietrobon, P., Bybel, M., Livingood, W. C., & Woodhouse, L. (2001). Choosing a Route of Administration for Quadrivalent Meningococcal Polysaccharide Vaccine: Intramuscular versus Subcutaneous. *Clinical Infectious Diseases*, 32(1), 170–172. <https://doi.org/10.1086/317553>
- Rudolph, R., & Lilie, H. (1996). In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(1), 49–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8566547>
- Ruusala, A., Persson, R., Schmauohn, C. S., & Pettersson, R. F. (1992). Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology*, 186(1), 53–64. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(92\)90060-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(92)90060-3)



- Safronetz, D., Hegde, N. R., Ebihara, H., Denton, M., Kobinger, G. P., St. Jeor, S., Feldmann, H., & Johnson, D. C. (2009). Adenovirus Vectors Expressing Hantavirus Proteins Protect Hamsters against Lethal Challenge with Andes Virus. *Journal of Virology*, 83(14), 7285–7295. <https://doi.org/10.1128/JVI.00373-09>
- Safronetz, David, Ebihara, H., Feldmann, H., & Hooper, J. W. (2012). The Syrian hamster model of hantavirus pulmonary syndrome. *Antiviral Research*, 95(3), 282–292. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.06.002>
- Safronetz, David, Haddock, E., Feldmann, F., Ebihara, H., & Feldmann, H. (2011). In vitro and in vivo activity of Ribavirin against Andes virus infection. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023560>
- Sánchez, O., Barrera, M., Rodríguez, M. P., Frías, M. T., Figueroa, N. E., Naranjo, P., Montesino, R., Farnos, O., Castell, S., Venereo, A., Ganges, L., Borroto, C., & Toledo, J. R. (2008). Classical swine fever virus E2 glycoprotein antigen produced in adenovirally transduced PK-15 cells confers complete protection in pigs upon viral challenge. *Vaccine*, 26(7), 988–997. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.014>
- Sánchez, O., Toledo, J. R., Rodríguez, M. P., & Castro, F. O. (2004). Adenoviral vector mediates high expression levels of human growth hormone in the milk of mice and goats. *Journal of Biotechnology*, 114(1–2), 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.06.009>
- Sandén, A. M., Prytz, I., Tubulekas, I., Förberg, C., Le, H., Hektor, A., Neubauer, P., Pragai, Z., Harwood, C., Ward, A., Picon, A., De Mattos, J. T., Postma, P., Farewell, A., Nyström, T., Reeh, S., Pedersen, S., & Larsson, G. (2003). Limiting factors in Escherichia coli fed-batch production of recombinant proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 81(2), 158–166. <https://doi.org/10.1002/bit.10457>
- Schmaljohn, C. S. (2012). Vaccines for hantaviruses: Progress and issues. *Expert Review of Vaccines*, 11(5), 511–513. <https://doi.org/10.1586/erv.12.15>
- Schmaljohn, C. (1997). Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*, Apr-Jun 3(2), 95–104.
- Schmaljohn, Connie. (2009). Vaccines for hantaviruses. *Vaccine*, 27(SUPPL. 4), 61–64. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.07.096>
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 363–372. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1656-9>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years

- of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675.  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Serruto, D., & Rappuoli, R. (2006). Post-genomic vaccine development. *FEBS Letters*, 580(12), 2985–2992. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.04.084>
- Shaw, F. E., Guess, H. A., Roets, J. M., Mohr, F. E., Coleman, P. J., Mandel, E. J., Roehm, R. R., Talley, W. S., & Hadler, S. C. (1989). Effect of anatomic injection site, age and smoking on the immune response to hepatitis B vaccination. *Vaccine*, 7(5), 425–430. [https://doi.org/10.1016/0264-410X\(89\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0264-410X(89)90157-6)
- Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2008). Effect of glycosylation on protein folding: A close look at thermodynamic stabilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(24), 8256–8261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801340105>
- Shental-Bechor, D., & Levy, Y. (2009). Folding of glycoproteins: toward understanding the biophysics of the glycosylation code. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(5), 524–533. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.07.002>
- Shi, X., & Elliott, R. M. (2004). Analysis of N-Linked Glycosylation of Hantaan Virus Glycoproteins and the Role of Oligosaccharide Side Chains in Protein Folding and Intracellular Trafficking. *Journal of Virology*, 78(10), 5414–5422. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.10.5414-5422.2004>
- Siddiqui, M. A. A., & Perry, C. M. (2006). *Vaccine ( Gardasil ®)*. 66(9), 1263–1271.
- Sieling, P. A., Wang, X. H., Oliveros, J. L., McHugh, T., Golkar, L., Yamamura, M., Yogi, Y., Uyemura, K., Modlin, R. L., Gately, M. K., Barnes, P. F., Rea, T. H., & Wolf, S. F. (1994). IL-12 regulates T helper type 1 cytokine responses in human infectious disease. *Journal of Immunology*, 153(8), 3639–3647.
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., & Higgins, D. G. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(539), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- Simmons, J. H., & Riley, L. K. (2002). Hantaviruses : An Overview. *Comparative Medicina*, 52(2), 97–110.
- Singh, A., Upadhyay, V., Upadhyay, A. K., Singh, S. M., & Panda, A. K. (2015). Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0222-8>
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body

- proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303–310. <https://doi.org/10.1263/jbb.99.303>
- Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., & Krogh, A. (1998). A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings. International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 6, 175–182. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9783223>
- Southern, E. (2006). Southern blotting. *Nature Protocols*, 1(2), 518–525. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.73>
- Sperber, H. S., Welke, R. W., Petazzi, R. A., Bergmann, R., Schade, M., Shai, Y., Chiantia, S., Herrmann, A., & Schwarzer, R. (2019). Self-association and subcellular localization of Puumala hantavirus envelope proteins. *Scientific Reports*, 9(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36879-y>
- Strandberg, L., & Enfors, S. O. (1991). Factors influencing inclusion body formation in the production of a fused protein in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1669–1674.
- Swartz, J. R. (2001). Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Current Opinion in Biotechnology*, 12(2), 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00199-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00199-3)
- Szabó, R. (2017). Antiviral therapy and prevention against hantavirus infections. *Acta Virologica*, 61(01), 3–12. [https://doi.org/10.4149/av\\_2017\\_01\\_3](https://doi.org/10.4149/av_2017_01_3)
- Szarewski, A. (2010). Drug Evaluation HPV vaccine: Cervarix. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 10(3), 477–487.
- Toledo, J. R., Prieto, Y., Oramas, N., & Sánchez, O. (2009). Polyethylenimine-Based Transfection Method as a Simple and Effective Way to Produce Recombinant Lentiviral Vectors. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 157(3), 538–544. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8381-2>
- Toledo, J. R., Sánchez, O., Montesino, R., Farnos, O., Rodríguez, M. P., Alfonso, P., Oramas, N., Rodríguez, E., Santana, E., Vega, E., Ganges, L., Frias, M. T., Cremata, J., & Barrera, M. (2008). Highly protective E2-CSFV vaccine candidate produced in the mammary gland of adenoviral transduced goats. *Journal of Biotechnology*, 133(3), 370–376. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.014>
- Tsirigos, K. D., Peters, C., Shu, N., Käll, L., & Elofsson, A. (2015). The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W401–W407. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv485>

- Tsumoto, K., Ejima, D., Kumagai, I., & Arakawa, T. (2003). Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein Expression and Purification*, 28(1), 1–8. [https://doi.org/10.1016/S1046-5928\(02\)00641-1](https://doi.org/10.1016/S1046-5928(02)00641-1)
- Tuuminen, T., Kekäläinen, E., Mäkelä, S., Ala-Houhala, I., Ennis, F. A., Hedman, K., Mustonen, J., Vaheri, A., & Arstila, T. P. (2007). Human CD8+ T cell memory generation in Puumala hantavirus infection occurs after the acute phase and is associated with boosting of EBV-specific CD8+ memory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(3), 1988–1995. <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20011255>
- Ulmer, J. B., & Geall, A. J. (2016). Recent innovations in mRNA vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 41, 18–22. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.05.008>
- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Mäkelä, S., & Mustonen, J. (2013). Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), 539–550. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3066>
- Van Epps, H. L., Terajima, M., Mustonen, J., Arstila, T. P., Corey, E. A., Vaheri, A., & Ennis, F. A. (2002). Long-lived memory T lymphocyte responses after hantavirus infection. *The Journal of Experimental Medicine*, 196(5), 579–588. <https://doi.org/10.1084/jem.20011255>
- Vartak, A., & Suheck, S. J. (2016). Recent advances in subunit vaccine carriers. *Vaccines*, 4(2), 1–18. <https://doi.org/10.3390/vaccines4020012>
- Vial, P. A., Valdivieso, F., Calvo, M., Rioseco, M. L., Riquelme, R., Araneda, A., Tomicic, V., Graf, J., Paredes, L., Florenzano, M., Bidart, T., Cuiza, A., Marco, C., Hjelle, B., Ye, C., Hanfelt-Goade, D., Vial, C., Rivera, J. C., Delgado, I., ... Ferres, M. (2015). A non-randomized multicentre trial of human immune plasma for treatment of hantavirus cardiopulmonary syndrome caused by Andes virus. *Antiviral Therapy*, 20(4), 377–386. <https://doi.org/10.3851/IMP2875>
- Vincentelli, R., Canaan, S., Campanacci, V., Valencia, C., Maurin, D., Frassinetti, F., Scappucini-Calvo, L., Bourne, Y., Cambillau, C., & Bignon, C. (2009). High-throughput automated refolding screening of inclusion bodies. *Protein Science*, 13(10), 2782–2792. <https://doi.org/10.1110/ps.04806004>
- Vinh, D. C., & Embil, J. M. (2009). Hantavirus pulmonary syndrome: a concise clinical review. *Southern Medical Journal*, 102, 620–625. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1097/SMJ.0b013e3181a4eeda>
- Wahl-Jensen, V., Chapman, J., Asher, L., Fisher, R., Zimmerman, M., Larsen, T., &

- Hooper, J. W. (2007). Temporal Analysis of Andes Virus and Sin Nombre Virus Infections of Syrian Hamsters. *Journal of Virology*, 81(14), 7449–7462. <https://doi.org/10.1128/JVI.00238-07>
- Wang, M., Pennock, D. G., Spik, K. W., & Schmaljohn, C. S. (1993). Epitope mapping studies with neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies to the G1 and G2 envelope glycoproteins of Hantaan virus. *Virology*, 197(2), 757–766. <https://doi.org/10.1006/viro.1993.1652>
- Warner, B. M., Safronetz, D., & Kobinger, G. P. (2017). Syrian Hamsters as a Small Animal Model for Emerging Infectious Diseases: Advances in Immunologic Methods. In G. Rezza & G. Ippolito (Eds.), *Emerging and Re-emerging Viral Infections: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 6* (pp. 87–101). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/5584\\_2016\\_135](https://doi.org/10.1007/5584_2016_135)
- Weickert, M. J., Doherty, D. H., Best, E. A., & Olins, P. O. (1996). Optimization of heterologous protein production in Escherichia coli. *Current Opinion in Biotechnology*, 7(5), 494–499. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(96\)80051-6](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(96)80051-6)
- Wheat, A. (2008). The quadrivalent human papillomavirus vaccine. *Medicine and Health, Rhode Island*, 91(12), 387–389. <https://doi.org/10.1086/520654>
- Wong, M. L., & Medrano, J. F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*, 39(1), 75–85. <https://doi.org/10.2144/05391RV01>
- Xu, Z., Wei, L., Wang, L., Wang, H., & Jiang, S. (2002). The in vitro and in vivo protective activity of monoclonal antibodies directed against Hantaan virus: Potential application for immunotherapy and passive immunization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(4), 552–558. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02491-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02491-9)
- Yin, J., Li, G., Ren, X., & Herrler, G. (2007). Select what you need: A comparative evaluation of the advantages and limitations of frequently used expression systems for foreign genes. *Journal of Biotechnology*, 127(3), 335–347. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.07.012>
- Zeier, M., Handermann, M., Bahr, U., Rensch, B., Müller, S., Kehm, R., Muranyi, W., & Darai, G. (2005). New ecological aspects of hantavirus infection: a change of a paradigm and a challenge of prevention--a review. *Virus Genes*, 30(2), 157–180. <https://doi.org/10.1007/s11262-004-5625-2>
- Zhang, L., Wang, W., & Wang, S. (2015). Effect of vaccine administration modality on immunogenicity and efficacy. *Expert Review of Vaccines*, 14(11), 1509–1523. <https://doi.org/10.1586/14760584.2015.1081067>

Zivcec, M., Safronetz, D., Haddock, E., Feldmann, H., & Ebihara, H. (2011a). Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Immunological Methods*, 368(1–2), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.004>

Zivcec, M., Safronetz, D., Haddock, E., Feldmann, H., & Ebihara, H. (2011b). Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Journal of Immunological Methods*, 368(1–2), 24–35. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2011.02.004>

