



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**

**“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD  
INMUNOGÉNICA DE EPÍTOPES  
TRANSPLANTADOS EN LA  
SUPERFICIE DE PROTEÍNAS SÉRICAS:  
HACIA EL DESARROLLO DE NUEVAS  
VACUNAS EPITÓPICAS”**

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE  
MAESTRO EN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA  
MOLECULAR

MANUEL ANTONIO MENDOZA AQUIJE

LIMA - PERÚ

2022



**ASESOR**

PHD. PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

**CO ASESOR**

PHD. MIRKO ZIMIC PERALTA

**JURADO DE TESIS**

DR. DANIEL GUERRA GIRALDEZ

PRESIDENTE

DRA. KATHERINE JESSICA TORRES FAJARDO

VOCAL

MG. IRENE ROSA MARÍA DELGADO DE LA FLOR MONTAUBAN

SECRETARIA

## **DEDICATORIA**

A mi padre y a mi madre, por enseñarme a dar mi mejor versión.

A mi esposa Paty, por apoyarme en la culminación de este proyecto y ser la otra mitad que mi equipo siempre necesita.

A mi hijo Gabriel, por ser mi energía y motivación día a día.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por darme la salud y la vida.

A mi asesora y co asesor, por el apoyo y la oportunidad de hacer investigación.

## **FUENTES DE FINANCIAMIENTO**

Tesis Autofinanciada

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. La Albúmina como proteína transportadora en suero por excelencia.....	3
1.2. La tecnología del diseño de una molécula transportadora basada en albúmina.....	5
1.3. Actualidad de la tecnología transportadora de drogas basada en albúmina: productos aprobados en el mercado.....	9
1.4. La cisteína de posición 34 en la albúmina sérica humana como blanco para el potencial diseño de agentes terapéuticos.....	11
1.5. Influencia de la tecnología de la fusión con albúmina en el campo clínico.....	13
1.6. Albuferon® y/o Albinterferon: nuevas opciones para el tratamiento anti-hepatitis.....	17
1.7. Sistemas transportadores basados en albúmina usados como posibles nuevas vacunas: Epítopes inmunogénicos transplantados en la superficie de la albúmina.....	21
1.8. Sistemas transportadores basados en albúmina usados como posibles nuevas vacunas: Epítopes inmunogénicos conjugados con albúmina sérica.....	23
1.9. Epítopes de Influenza seleccionados para el trasplante y conjugación.....	23
1.10. Justificación.....	24
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>25</b>
2.1. Pregunta de Investigación.....	26
2.2. Hipótesis.....	26
<b>III. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
3.1. Objetivo General.....	26
3.2. Objetivos Específicos.....	27
<b>IV. METODOLOGÍA.....</b>	<b>27</b>
4.1. Determinación de los mejores sitios de trasplante molecular en la albúmina mediante análisis bioinformático.....	27
4.1.1. Modelamiento basado en función RAPDF.....	29

4.2. Producción de una albúmina de ratón recombinante nativa, y transplantada con epítopes inmunogénicos de la hemaglutinina del virus Influenza A en su superficie.....	30
4.2.1. Purificación del ARNm y clonación del gen.....	30
4.2.2. Expresión del gen de albúmina.....	32
4.2.3. Optimización del uso de codones del gen de albúmina de ratón con un epítope de la hemaglutinina de influenza A transplantado.....	34
4.2.4. Purificación de la albúmina de ratón.....	35
4.2.5. Método de Bradford para cuantificación de la proteína purificada.....	36
4.3. Concentración de la proteína albúmina nativa y transplantada.....	37
4.4. Método de replegamiento de la albúmina de ratón concentrada.....	38
4.5. Determinación por absorción atómica de la actividad de la albúmina de ratón replegada a partir de la medida de la capacidad transportadora de zinc.....	39
4.6. Determinación de la eficiencia del replegamiento de la albúmina.....	40
4.7. Producción de vacunas basadas en epítope de Influenza A.....	41
4.8. Inmunización en ratones .....	42
4.9. Ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos epítope específicos y anticuerpos de memoria epítope específicos.....	46
4.10. Análisis estadístico.....	47
<b>V. RESULTADOS.....</b>	<b>48</b>
5.1. Determinación de los mejores sitios de trasplante molecular en la albúmina mediante análisis bioinformático.....	48
5.1.1. Modelamiento de optimización del epítope transplantado en la albúmina de ratón basado en función RAPDF.....	51
5.2. Producción de una albúmina de ratón recombinante nativa y transplantada con epítopes inmunogénicos de la hemaglutinina del virus Influenza A en su superficie.....	54
5.2.1. Expresión del gen de albúmina.....	57
5.2.2. Purificación de la albúmina de ratón.....	59
5.2.3. Método de Bradford para cuantificación de la proteína purificada.....	60
5.3. Método de replegamiento de la albúmina de ratón concentrada.....	61

5.4. Determinación por absorción atómica de la actividad de la albúmina de ratón replegada a partir de la medida de la capacidad transportadora de zinc.....	62
5.5. Determinación de la eficiencia del replegamiento de la albúmina.....	63
5.6. Cinética de la respuesta de anticuerpos epítoto específicos en ratones después de la inmunización con tres inoculaciones de vacuna.....	64
<b>VI. DISCUSIÓN.....</b>	<b>75</b>
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>89</b>
<b>VIII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>90</b>
<b>IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>92</b>
<b>X. ANEXOS</b>	

## RESUMEN

Las vacunas más importantes en la actualidad las constituyen principalmente proteínas recombinantes, las cuales se caracterizan por una rápida degradación y corto tiempo de circulación, por lo que su exposición al sistema inmune se limita a períodos breves. En ese sentido, múltiples dosis y refuerzos son necesarios para compensar esta limitación. Más recientemente se vienen probando con éxito las denominadas vacunas peptídicas, péptidos correspondientes a epítopes inmunogénicos/protectivos que se sintetizan químicamente y son administrados en varias dosis. Los epítopes son la porción clave de una proteína responsable de la inducción de inmunidad y protección. El uso de múltiples epítopes constituyen las denominadas vacunas multiepitópicas, las cuales fundamentalmente consisten de arreglos lineales de epítopes inmunogénico/protectivos unidos químicamente a la superficie de proteínas solubles que sirven de transportadores. Es importante remarcar que en este tipo de vacunas no se considera la estructura tridimensional de los péptidos, quedando éstos orientados básicamente de manera aleatoria sobre la superficie de la proteína transportadora sin mantener una estructura tridimensional estable.

El presente estudio demostraría una nueva estrategia para el transporte de epítopes inmunogénicos utilizando proteínas séricas grandes y estables (de largo tiempo de vida media en circulación), como la albúmina sérica. El objetivo principal fue prolongar el tiempo de vida media de los epítopes en circulación, y lograr que en su exposición al sistema inmune se asemeje lo más cercanamente posible a lo que sucede cuando el epítope forma parte de la proteína patógena, es decir lograr que la estructura tridimensional de los epítopes se conserve. Para ello, se seleccionó un epítope inmunogénico que fue “transplantado” sobre la superficie de una proteína sérica, como la albúmina, sin perturbar su estructura tridimensional original. Con esta “cirugía molecular” asistida por herramientas bioinformáticas de modelamiento y biología molecular se logró transplantar un epítope inmunogénico sobre la superficie de una proteína sérica propia del organismo a ser inmunizado, para crear una proteína inmunogénica transformada con características especiales y convenientes. El diseño molecular cuidadoso de esta proteína transformada otorgó al epítope seleccionado un ambiente que le permitió la adopción de una estructura tridimensional y una orientación hacia el solvente, similar a aquella que tiene el epítope cuando forma parte de la proteína patógena nativa.

El modelo utilizado para comprobar la ‘prueba de concepto’ de esta estrategia fue la hemaglutinina del virus influenza A, la proteína viral utilizada como vacuna contra esta infección. Para lograr este ‘transplante molecular’ del epítope se identificó

mediante herramientas bioinformático–estructurales, dominios localizados en la superficie de la proteína sérica ´receptora que tenían una estructura tridimensional similar a la correspondiente al epítoto cuando éste forma parte de la proteína patógena nativa. Con técnicas moleculares, el dominio más apropiado fue removido y reemplazado por el epítoto inmunogénico. Se expresó de manera recombinante una albúmina de ratón transplantada con uno de los epítotos inmunogénicos de la hemaglutinina del virus influenza A, previamente seleccionado. Se inmunizó ratones con la albúmina transplantada y con otras formas de presentación del mismo epítoto: conjugado químicamente a la albúmina de ratón recombinante, mezclado en solución con la albúmina recombinante, y el epítoto aislado; y se determinó la capacidad productora de anticuerpos anti-epítoto estimulada por cada forma de presentación del epítoto.

El presente estudio demostraría la ´prueba de concepto´ de que un epítoto transplantado sobre la superficie de una proteína sérica podría ser capaz de elucidar una respuesta inmune superior a la obtenida por el epítoto aislado o por el epítoto conjugado químicamente a la proteína sérica transportadora mediante una producción de anticuerpos anti-epítoto significativamente mayor, y que además se incrementa en el tiempo. Así mismo, luego de una exposición tiempo después al mismo epítoto se logra estimular la producción de anticuerpos anti-epítoto de memoria lo que sugiere que el epítoto transplantado en la proteína sérica transportadora no solo estimularía una mayor respuesta humoral sino también inmunidad de memoria.

**PALABRAS CLAVE:** Albúmina, epítoto, Influenza.

## **ABSTRACT**

The most important vaccines today are mainly recombinant proteins, which are characterized by rapid degradation and short circulation times, so their exposure to the immune system is limited to short periods. In that sense, multiple doses and boosters are necessary to compensate for this limitation. More recently, so-called peptide vaccines, peptides corresponding to immunogenic / protective epitopes that are chemically synthesized and administered in various doses, have been tested with success. Epitopes are the key portion of a protein responsible for the induction of immunity and protection. The use of multiple epitopes constitutes the so-called multiepitopic vaccines, which mainly consist of linear arrays of immunogenic / protective epitopes chemically bound to the surface of soluble proteins that serve as transporters. It is important to note that in this type of vaccines the three-dimensional structure of the peptides is not considered, leaving them oriented basically randomly on the surface of the carrier protein without maintaining a stable three-dimensional structure.

The present study would demonstrate a new strategy for the transport of immunogenic epitopes using large and stable serum proteins (with a long circulating half-life), such as serum albumin. The main objective was to prolong the half-life of the epitopes in circulation, and to achieve that in its exposure to the immune system it resembles as closely as possible what happens when the epitope is part of the pathogenic protein, that is, to achieve that the three-dimensional structure of the epitopes is preserved. For this, an immunogenic epitope was selected that was "transplanted" onto the surface of a serum protein, such as albumin, without disturbing its original three-dimensional structure. With this "molecular surgery" assisted by bioinformatic modeling and molecular biology tools, it was possible to transplant an immunogenic epitope on the surface of a serum protein of the organism to be immunized, to create a transformed immunogenic protein with special and convenient characteristics. The careful molecular design of this transformed protein gave the selected epitope an environment that allowed it to adopt a three-dimensional structure and an orientation towards the solvent, similar to that of the epitope when it is part of the native pathogenic protein.

The model used to verify the 'proof of concept' of this strategy was the hemagglutinin of the influenza A virus, the viral protein used as a vaccine against this infection. To achieve this 'molecular transplantation' of the epitope, domains located on the surface of the serum receptor protein were identified using bioinformatic-structural tools, which had a three-dimensional structure similar to that corresponding to the epitope when it is part of the native pathogenic protein. . With molecular techniques the most

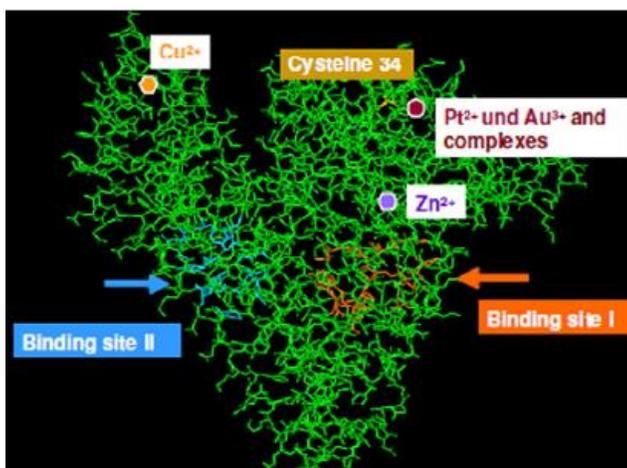
appropriate domain was removed and replaced by the immunogenic epitope. A mouse albumin transplanted with one of the previously selected immunogenic epitopes of the influenza A virus haemagglutinin was expressed recombinantly. Mice were immunized with the transplanted albumin and with other forms of presentation of the same epitope: chemically conjugated to the recombinant mouse albumin, mixed in solution with the recombinant albumin, and the isolated epitope, and the ability to produce anti-epitope antibodies was determined stimulated by each form of presentation of the epitope.

The present study would demonstrate the 'proof of concept' that an epitope transplanted on the surface of a serum protein could be capable of elucidating an immune response superior to that obtained by the isolated epitope or by the epitope chemically conjugated to the transporter serum protein by means of a significantly higher production of anti-epitope antibodies, which also increases over time. Likewise, after an exposure time later to the same epitope, it is possible to stimulate the production of anti-memory epitope antibodies, which suggests that the transplanted epitope in the serum transport protein would not only stimulate a greater humoral response but also memory immunity.

**KEY WORDS:** Albumin, epitope, Influenza.

## I. INTRODUCCIÓN

La albúmina es la proteína plasmática más abundante en ratones, humanos y otros animales, con una concentración de 35-50 mg/ml aproximadamente en el hombre (Kratz & Elsadek, 2011). Es una proteína transportadora de ligandos endógenos y exógenos importante en circulación, y contribuye al mantenimiento del balance osmótico (Sheffield et al., 2000). Su estructura tridimensional, analizada mediante rayos X, puede describirse como una macromolécula elipsoide con forma de corazón, que está conformada por 3 esferas flexibles o dominios (los dominios I, II y III) (Kratz, 2008). La albúmina es una de las proteínas más pequeñas presentes en el plasma sanguíneo, con un peso molecular de 66.5 kDa para la albúmina sérica humana (ASH). Así que tanto, su tamaño como su abundancia pueden explicar el hecho de que muchos compuestos metabólicos y drogas terapéuticas puedan ser transportadas por esta proteína (Kratz & Elsadek, 2011, Elsadek & Kratz, 2011).



**Figura 1.** Estructura tridimensional de la albúmina sérica humana (ASH) sin ácidos grasos determinada por rayos-X (pdb-entry 1ao6) donde se muestran los sitios de unión I y II para numerosas drogas, así como, sitios de unión para iones metálicos y complejos metálicos. Fuente: Elsadek & Kratz, 2011.

Una vez producida en las células parenquimales del hígado, y removidas sus secuencias pre y pro-peptídicas de señalización, la proteína es secretada en la circulación como una cadena poli peptídica simple. Las albúminas de los mamíferos comparten una serie de modificaciones post-traduccionales. Además de la formación de puentes disulfuro en su estructura, y la generación de tres dominios homólogos, carecen de glicosilaciones. Justamente, se sugiere que estos tres dominios internamente repetidos y la ausencia de glicosilación en la albúmina, podrían estar asociados con el lento perfil de filtración que presenta esta proteína en el organismo; por ejemplo, la albúmina sérica de conejo exhibe una vida media catabólica terminal de 5.56 días promedio, comparada a otras proteínas plasmáticas como el plasminógeno (1.31-1.86 días) o protrombina (1.7 días) (Sheffield et al., 2000). Igualmente, el tiempo de vida media de la albúmina sérica humana (ASH) es de, aproximadamente, 19 días (Kratz & Elsadek, 2011).

Esta proteína es usada para numerosos propósitos, entre ellos el tratamiento de quemaduras severas, síndrome nefrótico o para compensar estados de malnutrición o caquexia en pacientes con cáncer (Elsadek & Kratz, 2011). También es usada para el tratamiento de estrés respiratorio agudo, traumas quirúrgicos, hipoalbuminemia y hemodiálisis. Como una alternativa a la albúmina derivada de la sangre, se ha desarrollado genéticamente la albúmina sérica humana recombinante (Recombumina), la cual es expresada en células de levadura, mostrando seguridad, tolerabilidad, farmacocinética y farmacodinámica comparables a la albúmina sérica humana nativa (Kratz, 2008).

### **1.1. La albúmina como proteína transportadora en suero por excelencia**

La albúmina posee numerosos sitios de unión a sustratos metabólicos y drogas terapéuticas, que han sido extensivamente estudiados y descritos (Kratz & Elsadek, 2011). Entre estos sitios de unión se encuentran: sitios para ligandos endógenos (ácidos grasos, tiroxina, prostaglandinas) y iones metálicos (calcio, zinc, cobre), los sitios de unión I y II para ligandos exógenos (drogas como benzodiazepinas, antibióticos, drogas anti-inflamatorias, anticoagulantes, anestésicos) y iones metálicos tóxicos (oro, plomo) o complejos de oro o platino (Figura 1). En la actualidad, 78 análisis de estructuras que involucran a la albúmina, se han reportado en el *Protein Data Bank*, la mayoría de estas estructuras son co-cristales de albúmina sérica humana con ligandos endógenos y exógenos, y otras formas estructurales donde se ve a la albúmina fusionada o conjugada con ligandos o péptidos (Elsadek & Kratz, 2011).

Su tamaño pequeño, su extraordinaria flexibilidad, y su gran abundancia por sobre otras proteínas plasmáticas en el torrente sanguíneo, la hacen la proteína transportadora más versátil en circulación (Elsadek & Kratz, 2011). Las concentraciones de otras proteínas plasmáticas, consideradas principales, son más bajas, por ejemplo la transferrina tiene una concentración en el rango de 2.5-3.5mg/ml, aproximadamente. La transferrina es una proteína de 78kDa responsable de la transferencia de hierro (III) entre muchos diferentes tipos celulares como el epitelio intestinal, donde el hierro entra al cuerpo proveniente de la ingesta de alimentos; el hígado, donde es almacenado como ferritina (una proteína que contiene

complejos de hierro-fosfato-hidróxido); células eritroides en desarrollo que lo requieren para la síntesis de hemoglobina, y las células que necesitan el hierro para el crecimiento, incluyendo a las células tumorales. Otra molécula transportadora que atrajo la atención de los científicos con anterioridad, es la lipoproteína de baja densidad (LDL), principal transportador de colesterol a los tejidos. Se conoce la estructura de todas estas proteínas por análisis mediante rayos-X (Kratz & Elsadek, 2011).

Las principales razones para enfocarse en proteínas transportadoras como la transferrina y la albúmina podrían resumirse en dos: (1) ambas proteínas séricas con pesos moleculares de 78kDa y 66.5kDa, respectivamente, se encuentran por encima del umbral de filtración renal, tienen un largo tiempo en circulación, y de esa forma, pueden acumularse en tejido inflamado y maligno debido a la mayor penetración y efecto de retención. (2) el hecho de que 3 receptores dictan la biodistribución, así como, la toma celular de estas dos proteínas: (a) el receptor de transferrina que se encuentra sobre-expresado en células malignas, (b) el receptor gp60 en células endoteliales, que es responsable de la transcitosis de la albúmina y ayuda a transportar esta proteína dentro del intersticio tumoral y (c) el receptor Fc neonatal (FcRn), receptor de membrana que se une a IgGs y a albúmina sérica y es responsable del tiempo de vida media largo de ambas proteínas en el cuerpo (Kratz & Elsadek, 2011).

Aunque estas proteínas han sido investigadas como transportadoras de drogas, solo unos pocos conjugados de drogas con transferrina han entrado a ensayos clínicos

como drogas conjugadas o inmunotoxinas, y solo un diseño de inmunotoxina basada en transferrina ha alcanzado una etapa avanzada de evaluación clínica; TransMID® para el tratamiento de glioblastoma. Lo que es más, ningún sistema de entrega de droga basado en LDL ha entrado a etapa clínica. Por el contrario, el principal impacto clínico y comercial ha sido, indudablemente, con los sistemas de entrega de drogas basados en albúmina (Kratz & Elsadek, 2011).

La gran abundancia, los múltiples sitios de unión, y el elevado tiempo de vida media de la albúmina sérica humana, la hacen una proteína endógena ideal para poder mejorar las propiedades farmacocinéticas de péptidos terapéuticamente activos, o de fracciones pequeñas de anticuerpos. Además, la unión con albúmina no solo puede ayudar a reducir la pérdida y los costos de péptidos de alto valor, sino también, a mejorar su toma por parte del tejido afectado (Kratz & Elsadek, 2011).

## **1.2. Tecnología del diseño de una molécula transportadora basada en albúmina**

El uso del polietilenglicol (PEG) unido fisicoquímicamente a una proteína, es el método predominante para reducir la unión de proteínas plasmáticas a vectores no virales, prolongar la actividad, el tiempo de vida media, y retrasar la eliminación de un fármaco o proteína del organismo después de su administración intravenosa; de esa forma, se mejora la eficiencia de la acción de dicha proteína o fármaco (Guo & Huang, 2011). Sin embargo, la “PEGilación” en posiciones al azar puede afectar la bioactividad de la molécula modificada, y reducir la toma por parte de las células blanco. Este proceso, en algunos casos requiere de un trabajo exhaustivo de

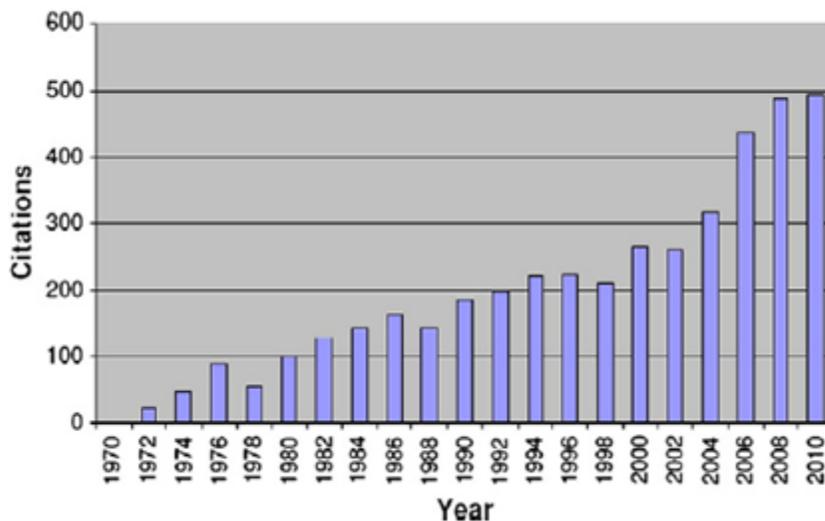
ingeniería genética y de un proceso de control de la calidad del potencial terapéutico de la molécula. (Müller et al., 2010).

La albúmina es una proteína ácida, muy soluble, y extremadamente resistente. Es estable en el rango de pH de 4 a 9, soluble en etanol 40%, y puede ser calentada a 60°C hasta por 10 horas sin efectos deletéreos. Estas propiedades, así como, la toma preferencial por parte de tumores y tejido inflamado, su biodisponibilidad, su perfil de degradación, y la falta de toxicidad e inmunogenicidad, dado que no participa de las defensas inmunológicas, la hacen un candidato ideal y ventajoso para la entrega de drogas (Kratz, 2008; Schulte, 2008).

La tecnología de la fusión con albúmina, involucra la expresión de una proteína terapéutica recombinante de larga acción, a partir de un cDNA producido en un plásmido que incluye al cDNA de la albúmina humana fusionado al extremo amino o carboxilo terminal del cDNA que codifica a la proteína terapéuticamente activa. Esta tecnología ha evolucionado como una estrategia general para crear fármacos proteicos de larga acción, y ha sido exitosamente aplicada a varias proteínas con distinta función biológica involucradas en el tratamiento de deficiencia de hormona del crecimiento (alb-hormona del crecimiento), neutropenia (alb-factor estimulante de granulocitos), diabetes mellitus (alb-péptido glucagón-like 1) y falla cardíaca congestiva (alb-péptido natriurético). Actualmente, se vienen haciendo estudios en el tratamiento de Hepatitis C usando al interferón-a2b fusionado con albúmina sérica humana. En su mayoría, estas proteínas de fusión a albúmina han sido desarrolladas por la empresa Human Genome Sciences, Inc. Como se puede ver, esta tecnología

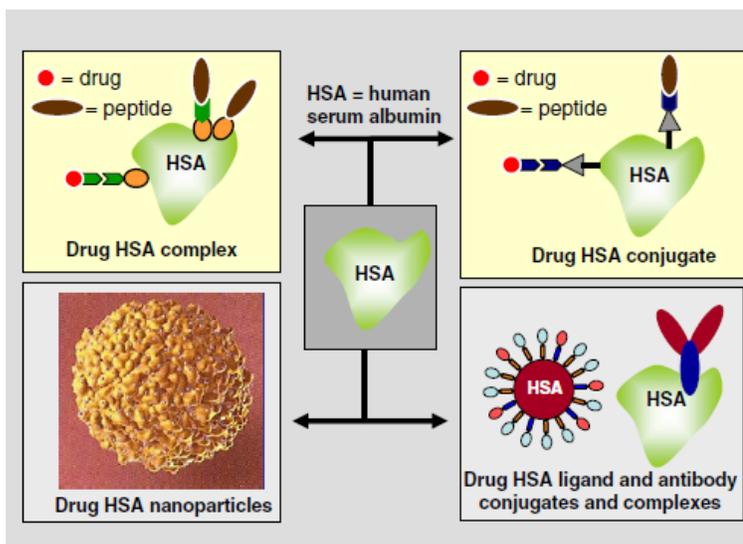
aprovecha las características ventajosas de la albúmina como son: su largo tiempo de vida media, gran volumen de distribución, bajo riesgo de afección inapropiada de la función enzimática o inmunológica, y su rol como molécula transportadora en sangre (Rustgi, 2009; Zhao et al., 2009).

De acuerdo a Elsadek & Kratz 2011, desde el año 1970 al 2010 hubo un aumento continuo de los artículos que mencionan a la albúmina como un transportador de drogas, y entre los años 2002 y 2010 este aumento se ha duplicado de 250 a 500 citas, aproximadamente. Este aumento, probablemente se debe al creciente interés que ha tomado esta molécula en aplicaciones farmacéuticas e industriales como transportador. La figura 2, muestra el incremento en el número de artículos citados en PubMed desde 1970 al 2010 que combinan las palabras claves “albúmina” con “transportador de drogas”.



**Figura 2.** Número de citas en PubMed que combinan las palabras claves “albúmina” y “transportador de drogas” desde 1970 al 2010 mostrados en intervalos de 2 años. Fuente: Kratz & Elsadek, 2011.

Existen cuatro principales tecnologías que usan a la albúmina como transportador de drogas, y que se resumen en el artículo de Elsadek & Kratz, 2011 (figura 3): en algunos casos las drogas, prodrogas o polipéptidos pueden estar, o unidos físicamente, o covalentemente a través de un ligando o grupo de unión a la albúmina sérica humana; también se han caracterizado sistemas más complejos, uniendo numerosos ligandos y prodrogas a la superficie de la proteína; o nanomoléculas o anticuerpos bi-específicos unidos físicamente o fusionados con la albúmina reemplazando el fragmento Fc de la inmunoglobulina G; finalmente, nanopartículas, estructuras micelares o microburbujas con drogas lipofílicas o agentes de diagnóstico pueden ser preparadas a manera de fórmulas solubles en agua para inyecciones intravenosas. En este último grupo, se encuentra la forma soluble del fármaco anticancerígeno paclitaxel, nab-paclitaxel, que se encuentra unido a nanopartículas de albúmina y mejora sus características farmacocinéticas y farmacodinámicas en el tratamiento de cáncer de mama y otros tipos de cánceres (Viúdez A, 2014).



**Figura 3.** Cuatro principales tecnologías de uso de albúmina como transportador de drogas. Fuente: Elsadek & Kratz, 2011.

### **1.3. Actualidad de la tecnología transportadora de drogas basada en albúmina: productos aprobados en el mercado**

Levemir®, es un producto derivado de la unión de insulina humana con albúmina sérica humana, para el tratamiento de diabetes tipo 1 y 2 aprobado en el 2004 en Europa. Aquí, el aminoácido treonina C-terminal en la insulina humana recombinante es reemplazado por una lisina, y luego, una molécula de ácido mirístico es covalentemente unida a su grupo amino  $\epsilon$ . El ácido mirístico posee una elevada afinidad por la albúmina sérica humana, y la unión con esta molécula transportadora le confiere a Levemir® un aumento en su tiempo de vida media, de 4 a 6 minutos en la insulina humana nativa a 5 a 7 horas para Levemir® (Elsadek & Kratz, 2011).

Abraxano®, es una nanopartícula soluble en agua, formada por la droga lipofílica paclitaxel y la albúmina sérica humana. Desarrollada por American Bioscience, fue aprobada en el 2005 para el tratamiento de cáncer metastático de seno. Esta nanopartícula se disuelve rápidamente después de una infusión intravenosa, y se acumula en el tumor sólido gracias al efecto permeable y a la participación del receptor gp60 que facilitan la toma de esta molécula dentro del tumor (Elsadek & Kratz, 2011).

El Albumod TM, es una tecnología que hace uso de dominios de unión a la albúmina de alta afinidad, los cuales son colocados en citoquinas, anticuerpos de cadena simple, o drogas; y posteriormente, unidos fuertemente a la albúmina produciendo un

aumento del tiempo de vida media en plasma de estos conjugados (Elsadek & Kratz, 2011).

La compañía belga Ablynx, logró desarrollar a partir del uso de anticuerpos de camélido, anticuerpos trivalentes murinos que son capaces de unirse, por un lado, a la albúmina sérica humana, y por otro, al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) humano o murino para el tratamiento de artritis reumatoide y cáncer (Elsadek & Kratz, 2011).

SAFTEY TM, es un sistema de entrega de drogas desarrollado por Diamond Light Source Ltd, Science Division, que consiste en la unión del nonapéptido RH01 miristilado (MyrFARKGALRQ) con albúmina sérica humana comercial libre de ácidos grasos, produciendo un complejo de elevada actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* in vitro (Elsadek & Kratz, 2011).

La tecnología de entrega de drogas basada en albúmina también ha sido usada en estudios para el tratamiento contra el virus HIV. Recientemente, se ha reportado que un péptido derivado de la región HR2 de la glicoproteína gp41 de la cápside del virus, abreviado como C34, es un potente inhibidor de la fusión de HIV en su paso para entrar a las células T. PC-1505, es un conjugado de albúmina sérica humana con el péptido C34, construido a partir de la unión covalente de un derivado de C34 que posee un grupo maleimida con la cisteína 34 de la albúmina sérica humana. Este conjugado presenta una potencia anti-viral sostenida en ratones infectados con HIV-1,

lo que mejora notablemente el perfil farmacocinético del péptido antiviral (Xie et al., 2010).

Es importante mencionar el éxito comercial de los productos que usan a la albúmina como transportador de drogas, y la entrada de estos a ensayos clínicos cada vez más avanzados. La variedad de moléculas que pueden aplicarse en la tecnología de sistema transportador basado en albúmina es muy grande, desde fragmentos de anticuerpos hasta moléculas tan simples como óxido nítrico. Por lo mencionado anteriormente, es de esperarse, que el interés de los científicos y compañías farmacéuticas aumente masivamente con el tiempo, así como también, el desarrollo y aplicaciones de esta tecnología transportadora.

#### **1.4. Cisteína de posición 34 en la albúmina sérica humana como blanco para el potencial diseño de agentes terapéuticos**

La cisteína 34, es un residuo conservado en la proteína que cumple una función fisiológica importante, ya que es sitio de unión para una variedad de moléculas pequeñas y provee de actividad antioxidante a la albúmina. También pueden observarse análogos de esta cisteína en roedores, conejos, perros y monos (Xie et al., 2010). Además, se ha observado que es la única cisteína libre tanto en la albúmina sérica humana como en la proteína de fusión IFN- $\alpha$ 2b-albúmina, pero su reemplazo por una serina mediante mutagenesis dirigida (C34S) que elimina el grupo sulfhidrilo libre y evita la formación de nuevos puentes disulfuro, produce un aumento considerable en la estabilidad de la proteína fusionada después de la agitación por 72

horas o la incubación a 60°C por 2 horas. Esto, contribuye a disminuir el incremento de la inmunogenicidad observada en ratones, y que está asociada a la formación de agregados debido al estrés mecánico o térmico. Si bien, esta mutación C34S es irrelevante para el tiempo de vida media en circulación de la albúmina sola o de la proteína de fusión, esta no afecta la actividad anti-viral de la proteína de fusión y permite un mayor índice de recuperación de producto purificado (Zhao et al., 2009). Los científicos le han prestado atención a la cisteína 34 porque es un sitio de unión para óxido nítrico (NO), lo que permite producir albúmina sérica humana S-nitrosilada, significativamente estable, y con el potencial para actuar como un reservorio o donador endógeno de NO en circulación. De esta forma, esta molécula podría tener aplicaciones terapéuticas importantes en anomalías cardiovasculares y tumores malignos cuyo desarrollo está relacionado a defectos en la producción de NO (Elsadek & Kratz, 2011). Las alloalbúminas, son variantes genéticas circulantes de la albúmina, producidas por mutaciones heredadas. De entre estas variantes, la albúmina Liprizzi (R410C) representa la única variante de albúmina con un residuo cisteína adicional (Cys-410) en el subdominio IIIa, el más activo en la molécula, además del residuo cisteína natural 34 en el subdominio I (Galliano et al., 1998). Investigaciones posteriores revelaron que la Cys-410 era más rápida y eficientemente nitrosilada que la cisteína 34, con muy pocos cambios conformacionales en la estructura de la proteína, fuerte actividad antibacteriana contra *Salmonella typhimurium* in vitro, y carácter supresor de apoptosis en células promonocíticas humanas U937 inducidas por Fas ligando. Esta observación sugiere que la existencia de múltiples sitios capaces de ser S-nitrosilados podría ser ventajoso para la

preparación de proteínas transportadoras NO basadas en albúmina (Elsadek & Kratz, 2011).

### **1.5. Influencia de la tecnología de la fusión con albúmina en el campo clínico**

El largo tiempo de vida media y la estabilidad de la albumina sérica humana, la hacen un candidato atractivo para su fusión con proteínas terapéuticas de vida corta. Por ello, en los últimos años se han desarrollado muchas proteínas de fusión que incluyen a la albúmina dentro de su ingeniería, y que han logrado establecer razones de estudio clínico y avances notables en tratamientos de enfermedades.

La Hemofilia B es un desorden genético ligado al cromosoma X debido a una deficiencia congénita de factor de coagulación IX dependiente de vitamina K (FIX). Este tipo de hemofilia es el segundo más común con una incidencia de alrededor de 1 en 25,000 varones nacidos. Para su tratamiento, son necesarias infusiones regulares de FIX debido a que su tiempo de vida media es de 18 – 34 horas, aproximadamente. La fusión del FIX con la albúmina, a través, de un conector conformado por la secuencia de aminoácidos 137 a 153 derivada de la región de activación N-terminal del FIX logró incrementar el tiempo de vida media del FIX en un 50% comparado con el FIX nativo (Schulte, 2009). El uso de este conector proteolizable, diseñado para remover la albúmina en paralelo con la activación del FIX, permitió aumentar la actividad específica *in vitro*, minimizar las formas protrombóticas del FIX fusionado activo, y disminuir los potenciales riesgos asociados a un tiempo de vida media aumentado en el FIX (Metzner et al., 2009). Por otro lado, algunos de los pacientes

con otro tipo de hemofilia, Hemofilia A, desarrollan inhibidores al factor VIII administrado para su tratamiento, y requieren de terapia con agentes como el factor VII activo o complejos de protrombina activos. El uso de la albúmina sérica fusionado al extremo C-terminal del FVIIa recombinante, a través, de un conector flexible de glicina y serina permitió generar una proteína de fusión del FVIIa recombinante con un tiempo de vida prolongado y que retiene su potencia terapéutica, comparado con productos comerciales de uso común como NovoSeven®; lo que se traduce en una menor frecuencia de dosis con la misma eficacia terapéutica, en comparación con algunos de los productos disponibles en el mercado actual (Schulte, 2008).

Los ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) están involucrados crucialmente en la regulación del sistema inmune, y también participan del desarrollo y homeostasis de los tejidos. La fusión de la albúmina sérica humana con 3 ligandos de la familia TNF de interés clínico (TRAIL, TWEAK y TNF) produjo proteínas de fusión de bioactividad similar a su contraparte sin albúmina fusionada, un tiempo de vida media prolongado, e inclusive la variante de fusión ASH-TRAIL mejoró considerablemente su actividad anti-tumoral *in vivo* (Müller et al., 2010). Siguiendo la misma línea, los receptores del factor de necrosis tumoral solubles humanos (shTNFR1 y shTNFR2), también han sido estudiados desde el punto de vista de proteínas de fusión basados en albúmina, ya que son antagonistas de TNF- $\alpha$  y tienen importancia en investigación clínica como terapia a enfermedades autoinmunes y rechazo en trasplantes de órganos. La fusión de los receptores con la albúmina

produjo proteínas de fusión que pudieron bloquear la actividad citolítica de TNF- $\alpha$  en clones de células L929 en ensayos *in vitro*, pero la actividad general de estas tres proteínas de fusión fue mucho más débil que el *Etanercept*, un inhibidor competitivo de la unión del TNF a sus receptores de superficie, lo que haría suponer que la tecnología de fusión a la ASH estaría influenciando significativamente la actividad neutralizante de los receptores solubles sobre TNF- $\alpha$ . (Zhan et al., 2011). Esto hace pensar, que el uso de esta tecnología para producir receptores solubles con una actividad neutralizante potenciada sobre TNF- $\alpha$  no sería una estrategia ideal, pero no nubla el interés puesto en el desarrollo de proteínas de fusión en el campo de estudio del TNF.

Por otro lado, la terapia de reemplazo de hormona del crecimiento (GH) es usada para tratar la deficiencia de esta molécula en el organismo. El tratamiento implica una administración diaria de GH debido a su corta vida media en plasma. La Albutropina, es una proteína de fusión originada a partir de la unión de la ASH con el extremo N-terminal de la GH humana. Esta fusión molecular permitió incrementar el tiempo de vida media, disminuir su tasa de filtración en el organismo, y obtener una acción equivalente a menor número de dosis, comparada con la GH sola en un estudio usando monos y ratas (Osborn et al., 2002).

La Tio redoxina (Trx) es una proteína pequeña del cuerpo humano con actividad redox que es inducida en respuesta a estrés oxidativo, regulando las condiciones redox intra y extracelulares. Además, posee la habilidad de remover radicales de oxígeno en colaboración con otra peroxidasa. Recientemente, algunos estudios vienen

explotando las actividades biológicas de la tioredoxina para el tratamiento de enfermedades causadas por el estrés oxidativo. La fusión de la ASH con Trx, permitió generar una proteína de fusión con propiedades farmacocinéticas similares a la albúmina, y de esa forma, mejorar las propiedades de retención en sangre de la Trx. Esta proteína fusionada, también mostró una alta distribución en pulmones de ratones a comparación de otros órganos, y una vida media en plasma 10 veces mayor a Trx haciéndola un candidato útil para el tratamiento de enfermedades pulmonares relacionadas a estrés oxidativo. (Furukawa et al., 2011).

La Barbourina, es una proteína de 73 aminoácidos, que se encuentra en el veneno de la serpiente cascabel pigmea del suroeste *Sistrurus barbourii*. Esta proteína, tiene una acción inhibitoria de plaquetas, y por ello es usada en modelos animales de trombosis. La fusión de la barbourina con la albúmina sérica de conejo, produjo una proteína de fusión de 76kDa con la habilidad de inhibición plaquetaria conservada *in vitro*, pero con un patrón de filtración del organismo mucho más lento en comparación a su contraparte no fusionada  $\approx <30\text{kDa}$  (Marques et al., 2001).

La tecnología de las proteínas de fusión basadas en albúmina también ha sido probada con éxito en el campo del desarrollo de anticuerpos. Siguiendo el mismo principio fundamental de esta técnica, la eficacia terapéutica de los anticuerpos recombinantes se ve mellada, muchas veces, por su peso molecular relativamente pequeño lo que se traduce en un tiempo de vida-media corto. De esta forma, la fusión de estas moléculas con la albúmina promueve la mejora de las propiedades farmacocinéticas de estas. Los anticuerpos bi-específicos recombinantes, son diseñados para tener como blanco

dos diferentes antígenos simultáneamente; este tipo de anticuerpos han sido exitosamente fusionados con la albúmina, conservando su capacidad total de unión a ambos antígenos y, además, aumentando enormemente su tiempo de vida media en circulación comparado a su contraparte no fusionada en ratones (Müller et al., 2007).

Todos los estudios mencionados anteriormente muestran la eficacia y el potencial de la tecnología de las proteínas de fusión basadas en albúmina. Pero, existe una proteína de fusión con propiedades anti-virales resaltantes, y que se encuentra en fase 3 de estudios en humanos. Esta proteína es el Albuferon® o Albinterferon, formada por la fusión entre la albúmina humana y el interferón, cuyos principales atributos se resumen en un notable aumento del tiempo de vida media en circulación, tasa de filtración reducida en el organismo, y propiedades anti-virales y anti-tumorales; lo que la convierten en el ejemplo perfecto, del aprovechamiento de la tecnología de sistemas de entrega de drogas basados en fusión con albúmina.

#### **1.6. Albuferon® y/o Albinterferon: nuevas opciones para el tratamiento anti-hepatitis**

El virus de hepatitis C crónico (VHC) es una de las causas más comunes de enfermedad hepática crónica, con casi el 3% de la población mundial afectada, y un número en aumento de pacientes que desarrollan complicaciones de cirrosis, incluyendo carcinoma hepatocelular. De entre los seis genotipos de VHC descritos, el genotipo 1 representa el 70% de todos los casos de hepatitis C crónico en América del

Norte y Europa, mientras, que los genotipos 2 y 3 representan el 20%-40% (Zeuzem et al., 2010; Nelson et al., 2010; Flisiak & Flisiak, 2010).

Los Interferones (IFNs), son una familia de citoquinas funcionalmente relacionadas, involucradas en una serie de respuesta celulares, y separadas en subclases tipo 1 y tipo 2. En humanos, los IFNs tipo 1 consisten de 13 genes funcionales IFN- $\alpha$  y un solo gen de IFN- $\beta$ , IFN- $\omega$  e IFN- $\kappa$ , mientras que el único IFN tipo 2 es el INF- $\gamma$ . A pesar de su diversidad en secuencia, todos los IFNs tipo 1 emplean un complejo receptor IFN heterodimérico tipo 1 común (Sung et al., 2003).

El tratamiento estándar actual recomienda el uso combinado de inyecciones semanales de IFN- $\alpha$ 2a o - $\alpha$ 2b PEGilado y dosis diarias de ribavirina. Aquí, se combinan los efectos moduladores del IFN sobre el sistema inmune y la actividad antiviral de la ribavirina. Para mal de los pacientes, este tratamiento está asociado con numerosos efectos adversos, entre los que destacan: cambios hematológicos, depresión, y síndrome gripal observado a inicios de la medicación, afectando la calidad de vida de los pacientes. De esa manera, el razonamiento de combinar la albúmina humana con el IFN- $\alpha$  es potenciar o conservar la actividad antiviral, con una presencia prolongada en sangre. (Flisiak & Flisiak, 2010). El Albinterferon alfa-2b (albIFN) es un polipéptido simple formado por la fusión genética de albúmina humana con IFN- $\alpha$ 2b, permitiendo extender el tiempo de vida media a casi 200 horas, y facilitando el cambio en los intervalos de dosaje. Un estudio de fase 3 en humanos demostró que el tratamiento con albIFN 900 $\mu$ g cada 2 semanas en combinación con ribavirina es eficaz para el tratamiento de pacientes con VHC crónico genotipo 1

(Zeuzem et al., 2010). Siguiendo la misma línea, otro estudio de fase 3 en humanos demostró que el tratamiento con albIFN 900µg, cada 2 semanas, en combinación con ribavirina es una alternativa eficaz para el tratamiento de pacientes con VHC crónico genotipo 2 o 3 (Nelson et al., 2010). Sin embargo, debido a que aún se observan efectos adversos marcados en estos tratamientos, se espera que los estudios de prueba de albIFN cada 4 semanas permitan develar notables mejoras a este problema (Pockros, 2010; Flisiak & Flisiak, 2010). Se ha demostrado también, que la fusión del extremo N-terminal del IFN al extremo C-terminal de la albúmina humana que genera al albIFN, posee efectos inhibitorios *in vitro* en la secreción de antígenos del virus de hepatitis B y en los niveles de DNA del virus; así mismo, esta proteína de fusión recombinante tiene una potente actividad anti viral contra el virus de hepatitis B en patos de Pekin (Bingfa et al., 2009).

El mejoramiento de la estabilidad y actividad anti-viral de esta proteína de fusión, también ha sido estudiado estableciéndose que la fusión del extremo N-terminal del interferón- $\alpha$ 2b directamente con el C-terminal de la albúmina produce una proteína no muy estable, sin embargo, la utilización de conectores amino-acídicos en forma de hélice (HL,AEAAAKEAAKA), produce un incremento en la actividad de la proteína de fusión, y el uso de conectores rígidos (RL, PAPAP) produce una mayor estabilidad durante el almacenamiento. Por lo tanto, el uso de este tipo de conector rígido para producir una proteína de fusión terapéutica de formulación líquida es algo de mucha utilidad e importancia para este campo de desarrollo tecnológico (Zhao et al., 2008).

Otra forma de Albinterferon, esta vez, fusionando interferón- $\beta$  con albúmina sérica humana produjo una proteína de fusión con actividad antiviral y antiproliferativa *in vitro*; además, se observó un prolongado tiempo de vida media y un reducido patrón de filtración del organismo en primates, así como, la generación sostenida de marcadores pro-inflamatorios (Sung et al., 2003). Ambas formas de proteínas de fusión, Interferón- $\alpha$ -albúmina e interferón- $\beta$ -albúmina, demostraron tener una potente actividad anti-viral *in vitro* contra RNAs virales que son considerados agentes de bioterrorismo, incluido el virus del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS) (Subramanian et al., 2008).

Otra molécula de la familia de los IFNs, IFN- $\gamma$ , también ha sido estudiada bajo el punto de vista de su fusión con albúmina para ayudar a incrementar el tiempo de vida media del IFN y reducir su filtración del organismo. El IFN- $\gamma$  fusionado genéticamente con albúmina sérica de ratón, a través, de un conector de 6 aminoácidos (Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Arg) fue insertado bajo la forma de cDNA en un plásmido no viral disuelto en solución salina e insertado en ratones mediante “transferencia genética” usando una inyección hidrodinámica en la vena de la cola. Esta proteína fusionada entregada genéticamente, demostró inhibir metástasis tumoral al mismo nivel que el IFN- $\gamma$  solo, convirtiéndose en una aproximación prometedora para prolongar el tiempo de vida media del IFN- $\gamma$  en circulación (Miyakawa, 2011).

### **1.7. Sistemas transportadores basados en albúmina usados como posibles nuevas vacunas: Epítopes inmunogénicos transplantados en la superficie de la albúmina**

La eficacia de un antígeno como una vacuna, depende parcialmente, de la duración de su exposición en el sistema inmune, así como también, del reconocimiento del sistema inmune de la estructura tridimensional de los epítopes inmunogénicos. Aproximaciones actuales del diseño de vacunas multiepitópicas, básicamente, consisten en la construcción de oligopéptidos en forma de arreglos lineares de los epítopes seleccionados. Estos oligopéptidos pueden ser obtenidos a través de sistemas de expresión de bacterias recombinantes y son usualmente entregados conjugados con transportadores. No se ha prestado especial atención a la estructura 3D de la molécula resultante ni tampoco a la estructura secundaria de los epítopes. Lo que es más, estas moléculas no tienen usualmente un tiempo de vida largo en el sistema circulatorio, y varias dosis son requeridas para alcanzar la inmunidad. Sciutto et al., (2004) realizó varios estudios de vacunas porcinas para cisticercosis, y demostró que fagos transformados genéticamente que exponen péptidos inmunogénicos en su superficie, proveen mejor protección que los péptidos aislados y que los péptidos ligados químicamente a una proteína transportadora. De forma notable, los fagos y en consecuencia, el antígeno patógeno, duraron por varias semanas circulando en el plasma en comparación con la degradación rápida de las proteínas recombinantes. Esta sería una posible explicación del efecto protector superior de los fagos transformados.

La secuencia de la albúmina sérica puede ser editada usando técnicas de biología molecular y mutagénesis dirigida, las cuales son muy efectivas en la actualidad. Es posible con estas técnicas reemplazar secuencias correspondientes a dominios de la superficie con epítopes inmunogénicos de patógenos. Las técnicas modernas de la bioinformática estructural y el modelamiento molecular nos brindan capacidades para explorar el efecto en la estructura tridimensional de la proteína luego de que tales reemplazos se realicen. La preservación de la estructura global de una proteína sérica transplantada asegura, en cierta medida, la conservación de diversas propiedades entre ellas un tiempo de vida similarmente largo en plasma. Aquí, se propone demostrar la ‘prueba de concepto’ sobre el beneficio de usar proteínas séricas transplantadas con epítopes inmunogénicos. Para ello se usará el modelo experimental de ratón, y los epítopes inmunogénicos a transplantar se tomarán del virus de influenza A. Como se ha visto anteriormente, el concepto de proteínas de fusión “*transplantadas*” no ha sido explorada aun en vacunas, pero ha sido exitosamente probada en el transporte y entrega específica de drogas proteicas, como el Albinterferon o Albuferon®. Los enfoques de la vacunación, a través, de los péptidos sintéticos han sido usados en un amplio rango de enfermedades. Uno de los patógenos más estudiados para los que se han hecho avances importantes con respecto a vacunas epitópicas, así como también, a vacunas proteicas recombinantes, es probablemente el virus de la influenza-A, para el que los modelos animales son usados en ensayos de vacunación. Por lo tanto, es conveniente adaptar este modelo bien estudiado a la evaluación de la “prueba de concepto” de esta novedosa estrategia.

### **1.8. Sistemas transportadores basados en albúmina usados como posibles nuevas vacunas: Epítopes inmunogénicos conjugados con albúmina sérica**

De acuerdo a lo mencionado con anterioridad, las albúminas de roedores, conejos, perros, y humanos poseen un residuo de cisteína conservado (en humanos y ratones cisteína 34), que tiene el único grupo tiol libre en la proteína. Xie et al., (2010) elaboró un conjugado de albúmina y péptido anti-HIV, a través del uso del ácido 3-maleimidopropiónico, el cual permitió la reacción irreversible de la maleimida con el grupo tiol libre para formar un conjugado específico péptido-albúmina en razón 1:1. Este conjugado mostró un mayor tiempo de vida media conservando su actividad anti-viral. En este estudio, se pretende demostrar que la conjugación de la albúmina sérica de ratón con el epítipo inmunogénico de Influenza a partir de la cisteína 34 libre de la proteína sérica, podría generar un complejo con mayor tiempo de vida media en circulación, y como consecuencia de ello, mayor tiempo de exposición del epítipo al sistema inmunológico, en comparación a la generada por el epítipo solo pero no a la generada por el epítipo transplantado en la superficie de la albúmina.

### **1.9. Epítopes de Influenza seleccionados para el trasplante y conjugación**

El efecto de algunas vacunas disponibles contra la Influenza es extremadamente variable. Las mejoras en estas vacunas usualmente involucran, entre otras estrategias, inmunización intranasal, nuevos adyuvantes, y el aumento de la dosis de hemaglutinina y antígenos de neuroaminidasa agregados a las proteínas purificadas (Cox, 1999; Corrigan, 1999; Martin, 1997; Couch, 1997).

En los últimos años, se ha sugerido el uso de vacunas epitópicas como nuevas estrategias para inducir actividad multi antiviral (Chen, 1999; Xiao, 2001). Se ha probado que la hemaglutinina (HA), una proteína de membrana del virus de influenza-A, regula la adhesión del virus y la liberación de su contenido en las células blanco siendo el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes (Wilson et al., 1990; Skehel et al., 2002). Como resultado de décadas de investigación, se han identificado varios epítopes neutralizantes en la hemaglutinina del virus Influenza A/Wuhan/359/95; por ejemplo, el péptido (HA aa183-199) cuando es conjugado con la toxina tetánica puede inducir respuesta humoral como a nivel de las células T, y proteger a los ratones Balb/c de la infección vírica letal (Simeckova-Rosenberg et al., 1995). Se ha probado que algunas otras regiones de la hemaglutinina tienen importantes características inmunogénicas: un estudio del 2003 mostró que los epítopes KAYSNCYPYDVDPDY (HA aa92-105), HHPITDSDQQTRLY (HA aa183-195), y WTGVAQD (HA aa127-133) inducen una fuerte respuesta inmune en ratones vacunados, mostrando actividad inhibitoria de la hemaglutinina, así como también, inhibición de la formación de la placa del virus de influenza-A (H. Li et al., 2003).

#### **1.10. Justificación**

El presente proyecto propone demostrar la “prueba de concepto” sobre el beneficio de usar proteínas séricas transplantadas con epítopes inmunogénicos. Para ello se usará el modelo en ratón del virus de influenza A. De acuerdo a estudios bioinformáticos

preliminares, la albúmina de ratón es una buena candidata para recibir el trasplante de los epítopes inmunogénicos de la hemaglutinina de influenza A.

De tener un resultado favorable, se podría estar demostrando la “prueba de concepto”, y en ese sentido, esta misma aproximación podría aplicarse a otros epítopes inmunogénicos de otros patógenos y abrir nuevas líneas de desarrollo de vacunas en el futuro.

## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La eficacia de un antígeno como una vacuna, depende parcialmente, de la duración de su exposición en el sistema inmune, así como también, del reconocimiento del sistema inmune a la estructura tridimensional de los epítopes inmunogénicos.

Aproximaciones actuales del diseño de vacunas epitópicas, básicamente, consisten en la construcción de oligopéptidos en forma de arreglos lineales de los epítopes seleccionados. Estos oligopéptidos pueden ser obtenidos a través de sistemas de expresión de bacterias recombinantes, y son usualmente entregados conjugados con transportadores.

Sin embargo, no se ha prestado especial atención a la estructura 3D de la molécula resultante, tampoco a la estructura secundaria de los epítopes. Es más, estas moléculas no tienen usualmente un tiempo de vida largo en el sistema circulatorio, y como consecuencia, varias dosis son requeridas para alcanzar la inmunidad.

## **2.1. Pregunta de investigación**

¿Será posible desarrollar un sistema de vacuna epitópica basada en un epítoto inmunogénico transplantado en la superficie de una proteína sérica de tiempo de vida prolongado en circulación, cuidando la estructura secundaria del epítoto, y mejorando así, la capacidad inmunogénica del propio epítoto?

## **2.2. Hipótesis**

Una proteína sérica de tiempo de vida media prolongado en circulación, como la albúmina, adaptada para llevar un epítoto inmunogénico transplantado en su superficie, y manteniendo la estructura secundaria del epítoto, mejora la capacidad inmunogénica del propio epítoto, comparada a la actividad estimulada por el mismo epítoto solo, o el epítoto conjugado químicamente a la proteína transportadora.

## **III. OBJETIVOS**

### **3.1. Objetivo General**

Demostrar la 'prueba de concepto' por el cual un epítoto inmunogénico transplantado sobre la superficie de una proteína sérica, tendrá mayor capacidad inmunogénica observada a partir de una mayor producción de anticuerpos epítoto específicos, comparada a la misma actividad observada en el epítoto solo, o el epítoto conjugado químicamente a la proteína sérica.

### **3.2. Objetivos Específicos**

- 1) Desarrollar una albúmina de ratón recombinante con un epítoto inmunogénico de hemaglutinina del virus influenza A H3N2 transplantado en su superficie.
- 2) Realizar la inoculación de grupos de ratones con diferentes formas de presentación del epítoto inmunogénico de Influenza A.
- 3) Comparar el título de anticuerpos epítoto específicos en los sueros de los ratones inmunizados con cada forma de presentación del epítoto inmunogénico de Influenza A.

## **IV. METODOLOGÍA**

### **4.1. Determinación de los mejores sitios de transplante molecular en la albúmina mediante análisis bioinformático**

Se usaron los tres epítotos inmunogénicos/protectivos reportados por Li et al., (2003) para transplantarlos sobre la superficie de la albúmina sérica de ratón. Para ello, se modeló la estructura de la Hemaglutinina del virus Influenza A H3N2 Wuhan 359/95, utilizando modelamiento por homología con el programa Swissmodel (<http://swissmodel.expasy.org/>). Para ello, se obtuvo del GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) la secuencia de aminoácidos de la región HA1 (región de unión a la célula del hospedero) de la hemaglutinina viral, y se modeló utilizando el mejor “molde” asignado por el programa (PDB ID: 1hge). Una

vez obtenido el modelo, se verifico la posición y tipo de estructura secundaria de los tres epítopes reportados.

De acuerdo a lo mencionado con anterioridad, la albúmina de ratón al ser una proteína globular formada por hélices alfa y loops, puede aceptar estos epítopes insertados en su superficie, reemplazando regiones de 'loops' similares. Sin que se vea perturbada de manera considerable la estructura tridimensional.

La estructura cristalizada de la albúmina de ratón fue modelada usando la aproximación por homología a partir de la estructura cristalina de la albúmina humana (PDB ID: 1AO6). Para refinar la estructura modelada se realizó la optimización geométrica por minimización de energía, y dinámica molecular de la proteína solvatada en una caja periódica de agua.

Las regiones similares a cada epítope en la albúmina de ratón, fueron determinadas usando los programas de alineamiento LALIGN (Pearson, 1999, 1998, 1996), y Tcoffee (Notredame, 2000), después de lo cual se realineó manualmente para mantener la continuidad y preservar la estructura secundaria.

El modelo estructural tridimensional de cada una de las albúminas transplantadas de ratón fue construido ejecutando mutagénesis dirigida *in silico* utilizando el programa Swiss PDB Viewer 4.01. Posteriormente, estas estructuras tridimensionales fueron refinadas por dinámica molecular simulando un tiempo de 800 nanosegundos, para poder revelar si los epítopes transplantados preservaron su estructura secundaria y su orientación al solvente, de modo similar a cuando forman parte de la hemaglutinina

nativa (ver anexo 1). Un análisis posterior de alineamiento estructural usando el mismo programa Swiss PDB Viewer 4.01, confirmó que la estructura tridimensional de la albúmina transplantada es similar a la albúmina nativa.

#### **4.1.1. Modelamiento basado en función RAPDF**

A modo de comparación con los resultados obtenidos por dinámica molecular, y para reconfirmar las posibles regiones de trasplante en la albúmina de ratón, se realizó un modelamiento estructural que combina aproximaciones computacionales basadas en Monte Carlo, con alineamientos simulados, algoritmos genéticos, teoría gráfica, y búsqueda semi-exhaustiva con combinaciones de movimientos derivados de las preferencias de las distribuciones  $\Psi/\Phi$  de aminoácidos. Estos parámetros son funciones de puntuación que consisten de preferencias de las distribuciones de todos los átomos basados en parejas, índices de hidrofobicidad, preferencias de estructura secundaria, puentes de hidrógeno, y el grado de agrupamiento exhibido en los extremos finales de las diferentes trayectorias.

Este conocimiento se basa en la función de probabilidad discriminativa residuo-específica para todos los átomos del sistema (RAPDF, Samudrala et al., 1998). Este es el núcleo de muchos aspectos del desarrollo de algoritmos para el diseño de proteínas que se han explorado para inmunogenes intactos de manera conformacional. Esta función calcula la probabilidad de una conformación de ser 'tipo-nativa' dado un juego de distancias inter-atómicas. Las probabilidades condicionales son compiladas calculando las frecuencias de distancias entre un par de tipos atómicos en una base de

datos de estructuras atómicas. Luego se compilan tablas de puntuación proporcionales a la probabilidad condicional del *log* negativo que se observa en una conformación nativa dada una distancia inter-atómica para todos los posibles pares de tipos atómicos. Dado un juego de distancias en una conformación, la probabilidad de que la conformación represente un 'plegamiento' correcto es evaluada sumando las puntuaciones para todas las distancias y sus correspondientes pares atómicos. Esta fase del modelamiento fue desarrollada en colaboración con el grupo de Biología Computacional de la Universidad de Washington encabezado por el Dr. Ram Samudrala.

## **4.2. Producción de una albúmina de ratón recombinante nativa y transplantada con epítopes inmunogénicos de la hemaglutinina del virus Influenza A en su superficie.**

### **4.2.1. Purificación del ARNm y clonación del gen**

Se purificó ARNm de un tejido con alta tasa de expresión de albúmina, como el hígado (ver anexo 2), para realizar RT-PCR con 'cebadores' oligodT. Los ratones usados para la extracción del ARN fueron hembras *Mus musculus* cepa Balb/c debido a que presentan una abundante cantidad de mensajero de albúmina en comparación al total de mensajeros presentes en el hígado (Clissold et al., 1981). El cDNA obtenido por retro-transcripción fue amplificado por PCR convencional usando 'cebadores' que amplifiquen a la albúmina, excluyendo la región que corresponde al péptido señal. Estos 'cebadores' llevaron en su secuencia sitios de reconocimiento para las

enzimas de restricción NcoI y XhoI permitiendo generar una cola de 6 histidinas en el extremo carboxilo terminal de la albúmina para su posterior purificación por cromatografía de afinidad. La secuencia de los cebadores es como sigue: forward 5'-CATGCCATGGAAGCACACAAGAGTGAG-3; reverse 5'-CCGCTCGAGGGCTAAGGCGTCTTTGC-3'. El producto de PCR del gen de albúmina nativa fue clonado en el sistema pET (*Novagen*), el cual permite una purificación de proteínas blanco más sencilla. Este vector de clonación/expresión contiene el sitio de unión para el ribosoma de la proteína de cápside mayor del fago T7 y es usado para la expresión de genes blanco que no tienen su propio sitio de unión al ribosoma (ver anexo 3). Para la clonación del gen, primero los productos fueron cortados con las enzimas de restricción NcoI y XhoI, y de la misma forma el vector Pet28a (*Novagen*). En segundo lugar, el producto de PCR y el vector, que ahora poseen extremos cohesivos y complementarios entre sí, fueron ligados para formar el constructo pET + albúmina. Para comprobar la identidad nucleotídica de la secuencia del gen de albúmina insertado en el vector, los plásmidos extraídos fueron secuenciados por la empresa Macrogen, USA. El secuenciamiento fue realizado utilizando los cebadores universales del promotor T7 en forward: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG - 3', y del terminador T7 en reverso: 5'-GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'. Utilizando la herramienta de alineamiento simple Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) se determinó la secuencia nucleotídica del gen, y la herramienta de traducción Translate (<http://web.expasy.org/translate/>) permitió confirmar la identidad de la secuencia aminoacídica la proteína albúmina recombinante. Finalmente, el constructo fue

transformado en células competentes Novablue (*Novagen*), un tipo de bacteria *E.coli* de cepa K-12, ideal como hospedero inicial de clonación por su alta eficiencia de transformación y su genotipo especial que permite obtener una alta calidad de DNA plasmídico de estas. Las células competentes Novablue fueron preparadas y transformadas según se señala líneas abajo en “*preparación de las células competentes*” y “*transformación de las células competentes*”.

#### **4.2.2. Expresión del gen de albúmina.**

*Preparación de las células competentes* - Para la expresión las células más comúnmente utilizadas son las BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* (Novagen, USA). Estas células son lisógenos del bacteriófago DE3, un derivado lambda que tienen la región inmunitaria del fago 21 y lleva un fragmento de ADN conteniendo el gen *lac I*, el promotor *lac UV5* y el gen para la T7 RNA polimerasa, y es insertado en el gen *int* evitando que el DE3 se integre o sea escindido del cromosoma sin un fago ayudador. Una colonia de estas células fue sembrada por agotamiento en una placa con LB (Luria Bertani) agar sin antibiótico y paralelamente en una placa con el antibiótico kanamicina (40µg/ml) para asegurar la ausencia de algún plásmido que confiera resistencia. Una colonia fue transferida a 2 ml de medio LB e incubada a 37°C con agitación durante toda la noche. Un mililitro del cultivo fue inoculado en 50 ml de medio LB sin antibiótico, y mantenido en incubación a 37°C con agitación hasta que su densidad óptica a 600 nm se encontró entre 0.35 y 0.45. El contenido fue transferido a un tubo nuevo, incubado en hielo durante 10 minutos y centrifugado a 2683.2 x g y a 4°C por 10 minutos. Sobre el pellet recuperado se añadió 20 ml de

CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y glicerol frío 15%; la mezcla homogenizada fue incubada en hielo por 15 minutos y nuevamente centrifugada a 1509.3 x g y a 4°C durante 10 minutos. El pellet fue resuspendido y homogenizado con 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M y glicerol frío 15%. Las células competentes fueron repartidas en alícuotas de 50 µl y almacenadas a -70°C. Para comprobar su viabilidad, las células fueron sembradas por agotamiento en medio LB – agar sin antibiótico y en otro con kanamicina (40µg/ml). Un procedimiento similar fue seguido para la preparación de las células *Novablue* competentes utilizadas en la clonación del gen de albúmina.

Transformación de las células competentes - Tres tubos con células competentes fueron descongelados durante 10 minutos en hielo. Posteriormente, se les añadió entre 40 a 100 ng de constructo de albúmina. Para asegurar la calidad del proceso se incluyeron un control de transformación negativo y positivo. Las células fueron incubadas en hielo durante 30 minutos, luego a 42°C durante 50 segundos y nuevamente en hielo por 2 minutos (transformación por choque térmico). Quinientos microlitros de medio LB estéril fueron añadidos a las células, incubándolas por 1 hora a 37° C con agitación fuerte. Alícuotas de 50 µl fueron sembradas en placas LB-agar con kanamicina (40µg/ml) e incubadas toda la noche a 37°C.

Expresión - Después de sembrar por agotamiento una colonia de la célula BL21 (DE3) pLysS de *E. coli* (Novagen) en una placa con LB-agar y kanamicina (40 µg/ml), se dejó incubar toda la noche a 37°C. Una colonia fue cultivada en 10 ml de caldo LB-kanamicina (40 µg/ml) por cuadruplicado dejándola crecer a 37°C en agitación hasta el día siguiente. 10 ml de cultivo fueron transferidos a 4 matraces de

250 ml de caldo LB - kanamicina (40 µg/ml) en una dilución 1/25 del cultivo y manteniéndolo en incubación a 37°C con agitación, hasta que la absorbancia a 600 nm estuvo en el rango 0.5-1 OD. Debido a que el plásmido contiene el gen *lac I*, la expresión fue inducida agregando 250 µl de isopropil β-D-tiogalactosido (IPTG) 1M incubando el cultivo en agitación durante 6 horas a 37°C. Las células fueron centrifugadas a 6037.2 x g y a 4°C por 20 minutos y el pellet obtenido fue resuspendido en 20 ml de tampón de unión pH 7.4 (fosfato sódico 20mM, NaCl 0.5 M, imidazol 20 mM). Las células resuspendidas fueron almacenadas a -70°C. Para ver la diferencia en la expresión proteica antes y después de agregar el IPTG, alícuotas fueron tomadas de los cultivos en ambos momentos y sometidas a una electroforesis tal como se describe en los *métodos de purificación*.

#### **4.2.3. Optimización del “uso de codones” del gen de albúmina de ratón con un epítipo de la hemaglutinina de Influenza A transplantado.**

En función a los resultados obtenidos por el modelamiento basado en función RAPDF se seleccionó al epítipo KAYSCNCYPYDVDPDY insertado en la posición 494-508 de la albúmina sérica de ratón como el candidato a ser sintetizado y probado experimentalmente. El gen de albúmina transplantada tiene los codones más usados por el ratón pero necesita ser expresado en un sistema procariota. Por tal motivo, la secuencia de nucleótidos del gen fue modificada de acuerdo a los codones más frecuentemente usados por *E. coli* mediante el programa Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) (Pere, 2007). De esta manera, la secuencia modificada sería bien reconocida en bacteria logrando mejorar la cantidad de proteína

expresada del gen y la solubilidad de la proteína resultante. Además, se incluyó los sitios de restricción NcoI y XhoI en la secuencia para el proceso de clonamiento y generación de la cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal con fines de la purificación (ver anexo 7). El gen optimizado fue sintetizado por la empresa Genemed Synthesis, Inc.

#### **4.2.4. Purificación de la albúmina de ratón.**

Obtención del extracto crudo - Las células congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ , fueron descongeladas a  $37^{\circ}\text{C}$  y congeladas nuevamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ , tres veces. En un baño de hielo, la suspensión fue sonicada con un nivel de poder de 3 por 3 ciclos (cada ciclo consiste de 1 segundo activo y 1 segundo inactivo durante un minuto con descansos de 3 minutos entre cada ciclo). El lisado celular fue centrifugado a  $12581x\text{ g}$  y a  $4^{\circ}\text{C}$ , durante 30 minutos. El sobrenadante conteniendo la fracción soluble de interés fue recuperado finalmente.

Cromatografía de afinidad - Para la cromatografía de afinidad se usó la columna “His-trap chelating” (Pharmacia, Suecia) de capacidad de 5 ml. El sistema de cromatografía también incluyó los siguientes elementos: una bomba peristáltica P-1 que permitió la entrada de la muestra y de los tampones a la columna, un colector de fracciones conteniendo tubos de vidrio de 6 ml, un detector y una registradora donde se elaboró el cromatograma. Los tampones usados fueron: fosfato sódico 20mM, NaCl 0.5 M y diferentes concentraciones de imidazol: 20mM (tampón de unión), 40 mM, 60 mM, 100 mM, 300 mM, 500 mM, a pH 7.4. Después de equilibrar la

columna con 5-10 volúmenes del tampón de unión, se agregó 5-10 volúmenes de tampón fosfato sódico 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 500 mM, pH 7.4 y nuevamente 5-10 volúmenes de tampón de unión. La fracción soluble fue cargada en dos partes para evitar sobrepasar la capacidad de la columna (12 mg/ml de proteína). Para proseguir con una segunda carga de la muestra, la columna fue lavada con 5-10 volúmenes de tampón de unión. La cuantificación de la proteína se realizó mediante el método de Bradford.

#### *Electroforesis de la proteína concentrada en geles de poliacrilamida SDS-PAGE -*

La proteína purificada se resolvió en un gel SDS-PAGE estándar. Aquí, 2 microgramos de proteína purificada y concentrada fueron usadas en la electroforesis (10  $\mu$ l de proteína 0.2 mg/ml).

#### **4.2.5. Método de Bradford para cuantificación de la proteína purificada**

Este método colorimétrico que es comúnmente usado para determinar la concentración de proteína total de una muestra se basa en la unión proporcional del colorante azul de Coomasie a las proteínas. Conforme halla más concentración proteica más oscura se tornará la muestra. BSA (albúmina de suero bovino) fue preparada para un stock de 10 mg/ml y diluida 1/10 para la preparación de los estándares. 20 microlitros de estándar y de muestras diluídas fueron colocados en una placa de poliestireno de 96 pocillos con fondo plano, junto con 200  $\mu$ l del colorante diluido 1/5. Luego de un reposo a temperatura ambiente por 5 minutos la placa fue leída a 595 nm en el espectrofotómetro.

### **4.3. Concentración de la proteína albúmina nativa y transplantada**

Para concentrar la proteína purificada por cromatografía de afinidad se usó el sistema AMICON® Stirred Cell (EMD Millipore). Este sistema fue conectado a gas nitrógeno que ejerció la presión para lograr pasar la solución de proteína a través de una membrana con 10 kDa de tamaño de poro, lo cual evitó filtrar la proteína de 67 kDa y permitió concentrarla de manera eficiente. Este ensayo se realizó a temperatura de 4°C y en agitación para evitar la desnaturalización de la proteína. Inicialmente, el sistema AMICON® se desarmó y se lavó con agua hervida, la membrana de concentración también fue tratada de la misma manera. Seguidamente, se rearmó el sistema, y se colocaron las fracciones que contenían proteína purificada hasta alcanzar un volumen igual a  $\frac{3}{4}$  de la capacidad total del sistema. Luego, se agregó 10 ml de Buffer A (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7.8) como tampón de lavado, y se abrió el flujo de presión para iniciar la concentración. Cuando el volumen de solución en la parte superior de la membrana llegó a 10 ml, se agregó más fracciones de proteína purificada hasta que el sistema nuevamente alcanzó un volumen de solución en la parte superior de la membrana equivalente a 10 ml. A continuación, se agregaron 150 ml de Buffer A al sistema en agitación hasta alcanzar un volumen de 4 ml dentro del sistema. Finalmente, estos 4 ml fueron recolectados en tubos de 1.5 ml y centrifugados por 1 minuto a 10 000 RPM para precipitar cualquier contaminante.

#### **4.4. Método de replegamiento de la albúmina de ratón concentrada**

Debido al uso de un hospedero de expresión procariota (*E. coli* BL21) para inducir la producción de la proteína albúmina de origen eucariota, se observó que gran parte de la proteína se expresó en cuerpos de inclusión insoluble. Por ello, se planteó el desarrollo del método de replegamiento adaptado de Chen y colaboradores, 1992.

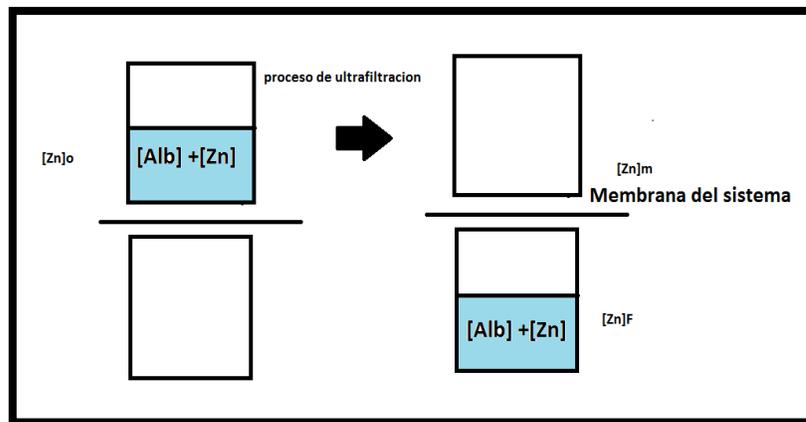
Esta técnica de replegamiento consistió en la eliminación secuencial y progresiva de la urea contenida en el buffer donde se encuentra resuspendida la proteína albúmina. Para eliminar la urea totalmente del medio donde se encuentra la proteína de interés, se utilizaron soluciones tampón con concentraciones de urea decrecientes que fueron pasadas a través del sistema AMICON® Stirred Cell (EMD Millipore). Este sistema incluyó el uso de una membrana de 10 kDa de tamaño de poro, que garantizó que la proteína murina de 67 kDa permanezca en la parte superior del sistema, y que la urea pase a través de la membrana siendo separada de la proteína. De esta manera, a medida se fueron agregando las diferentes soluciones buffer con urea en concentraciones decrecientes, la urea fue siendo removida de la solución de suspensión de proteína de manera controlada. Por último, la proteína fue suspendida en una solución buffer sin urea que contenía los mismos componentes de las soluciones buffer usadas anteriormente para garantizar la estabilidad de la proteína (ver anexo 4).

#### **4.5. Determinación por absorción atómica de la actividad de la albúmina de ratón replegada a partir de la medida de la capacidad transportadora de zinc**

Si la albúmina de ratón solubilizada se encuentra correctamente plegada podrá ser capaz de funcionar como transportador de manera adecuada. Se sabe que la albúmina de ratón es capaz de transportar zinc con alta afinidad y que posee un sitio de unión para este ion metálico (UniProtKB - P07724). Para determinar cuanta albúmina de la solución solubilizada se encuentra correctamente plegada, se implementó un ensayo donde una solución de albúmina recombinante solubilizada, a una concentración conocida, fue incubada con una solución de cloruro de zinc de concentración conocida en un volumen total de 50 ml y en agitación usando el sistema AMICON®. Seguidamente, se dejaron pasar a través de la membrana de 10kDa de poro 25 ml de la resuspensión de proteína y zinc, se tomaron 25 ml de la solución que no pasó a través de la membrana del sistema AMICON® y los 25 ml que eluyeron a través de la membrana, y se midió la concentración del zinc en cada una de las dos fracciones por absorción atómica. De la misma manera, para observar posibles interferencias en las mediciones se enfrentó a este ensayo una muestra de la solución del buffer de resuspensión de la proteína, y del agua miliQ que sirvió para preparar las diferentes soluciones de cloruro de zinc. Se espera que si la albúmina es capaz de transportar/atrapar zinc de manera eficiente, la concentración de zinc debe ser menor en la resuspensión que eluyó a través de la membrana, puesto que la albúmina ya atrapó el zinc antes de pasar por la membrana (ver anexo 5).

#### 4.6. Determinación de la eficiencia del replegamiento de la albúmina

Para determinar la eficiencia de replegamiento de la albúmina, es decir, cuanta proteína se encuentra bien plegada en la solución, se usaron los resultados obtenidos en el ensayo de absorción atómica y la concentración de la proteína previamente determinada por Bradford. Las muestras fueron incubadas 4 horas a 25°C en movimiento. Se separó 25 ml de solución para medir la concentración de zinc inicial ( $[Zn]_o$ ). Los 25 ml restantes fueron ultrafiltrados en el sistema AMICON® y recolectados ( $[Zn]_f$ ) (figura 4).



**Figura 4.** Esquema del ensayo de determinación de la eficiencia de replegamiento de la albúmina de ratón.  $[Zn]_o$ ,  $[Zn]_f$  y  $[Zn]_m$ , corresponden a la concentración de zinc inicial, final y retenido por la membrana, respectivamente.

Así mismo, se realizó mediciones de zinc al stock de las proteínas (albúmina recombinante con epítipo transplantado y albúmina recombinante nativa de ratón) y el buffer 20 mM Tris-HCl para verificar la existencia de falsos positivos en los resultados. También, se incluyó un análisis de capacidad de captación de zinc de una

albúmina nativa recombinante en urea a manera de control negativo, puesto que la cadena polipeptídica no presentaría el sitio de unión a este ion correctamente plegado.

A continuación, se muestran las ecuaciones que representan al sistema de (1) solución de zinc en ausencia de proteína, y (2) solución de zinc en presencia de la proteína, respectivamente:

- 1)  $[Zn]_m = [Zn]_o - [Zn]_f$  ; cambios en la concentración de zinc debido a la membrana del sistema sin intervención de la albúmina,
- 2)  $[Zn]_o - [Zn]_f = \alpha \beta [Alb] + [Zn]_m$  ; cambios en la concentración de zinc con presencia de la albúmina en el sistema.

Dónde:

$\alpha$ : estequiometría del número de iones unidos por molécula de albúmina,

$\beta$ : % de replegamiento de la proteína.

Posteriormente,  $\beta$  es adecuado al Gold Estándar (albúmina nativa de ratón de origen comercial) para obtener el valor de % de replegamiento.

#### **4.7. Producción de vacunas basadas en epítoto de Influenza A H3N2**

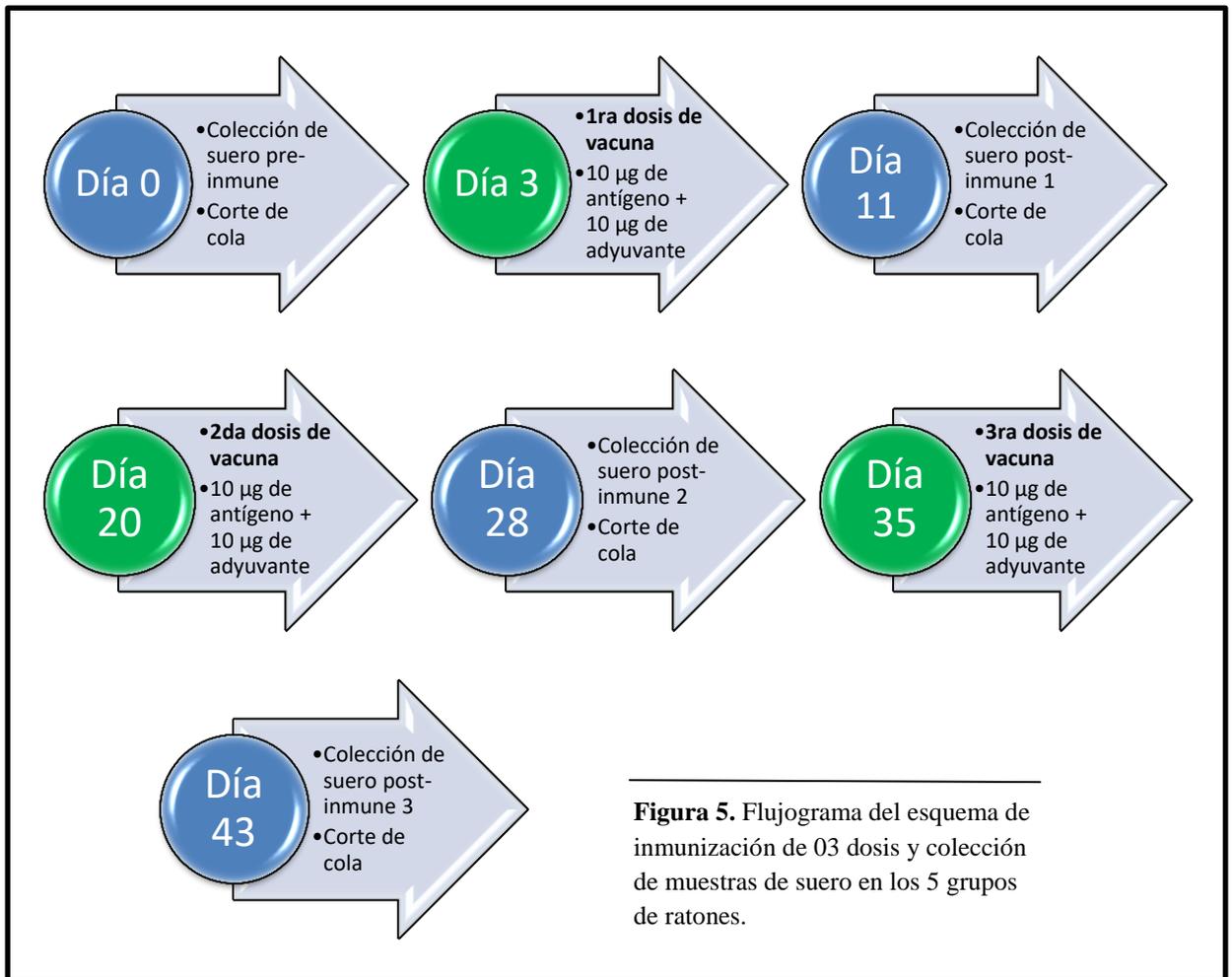
El epítoto inmunogénico de secuencia: KAYSNCYPYDVPDY, fue sintetizado químicamente, y adquirido con una pureza > 90% y en cantidad de 10 mg de la empresa biotecnológica Genemed Synthesis, Inc. Utilizando el epítoto sintetizado químicamente se diseñaron algunas vacunas basadas en epítoto para la inmunización de grupos de ratones. Uno de estos antígenos (vacunas) presentó al epítoto peptídico conjugado químicamente a la albúmina nativa recombinante, y otro antígeno, al

epítoto conjugado químicamente a albúmina de ratón comercial (Sigma, prod. Number A 3559). Para elaborar estos antígenos conjugados, se utilizó el conjugador heterobifuncional m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinamida éster (MBS) (Thermo Scientific N. 22311) para generar una unión química entre el péptido y la albúmina de ratón. El péptido fue disuelto en buffer de conjugación (PBS, pH 7.2. Thermo Scientific, producto N. 28372) a concentración final de 0.1 mM. Se agregó el agente conjugador a concentración de 1 mM. La reacción fue incubada por 30 minutos a temperatura ambiente y eluída a través de la columna de desalinización (Zeba<sup>TM</sup> Spin Desalting Columns) para remover el exceso de agente conjugador. El péptido y la albúmina de ratón (recombinante o comercial) se combinaron en una razón molar 1:1 y la mezcla fue incubada a temperatura ambiente por 30 minutos. Otra vacuna basada en epítoto se preparó a partir de una mezcla del epítoto peptídico con albúmina de ratón nativa recombinante a una razón molar 1:1. Finalmente, soluciones de epítoto peptídico y albúmina de ratón comercial, preparadas por separado, fueron utilizadas como controles en el ensayo de inmunización.

#### **4.8. Inmunización en ratones utilizando las vacunas basadas en epítoto**

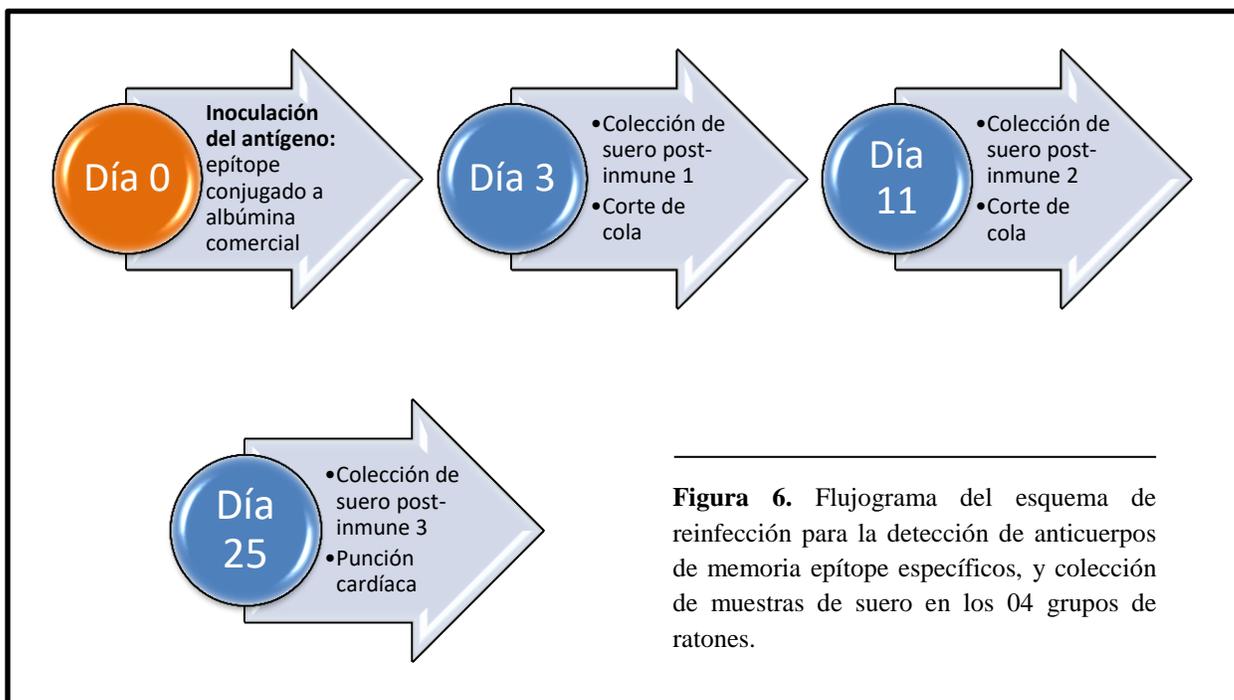
La ejecución de la parte experimental del proyecto que no incluye el trabajo con animales se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular (LID – UPCH). La adquisición y el alojamiento de los ratones durante el tiempo de ejecución del proyecto se llevaron a cabo en el Bioterio del LID-UPCH, el cual cuenta con ambientes adecuados (temperatura, alimentación, etc.) para el manejo de estos animales. Se inmunizaron 04 grupos de ratones (10 animales por grupo) de

manera intraperitoneal, donde a cada grupo se le administró una de las 04 vacunas producidas por separado: (1) albúmina con epítoto transplantado, (2) epítoto conjugado a albúmina nativa recombinante, (3) epítoto mezclado con albúmina nativa recombinante, y (4) epítoto peptídico. En el primer día (día 0), se colectaron muestras de suero pre-inmune por corte de cola de todos los 5 grupos de inmunización. 03 días después se administró la primera dosis de vacuna conteniendo 10 µg de antígeno más 10 µg de adyuvante Quil-A® (Brenntag, lyophilized powder). 11 días después del inicio del ensayo de inmunización, se colectó la primera muestra de suero post-inmune de todos los grupos de ratones por corte de cola. Una segunda dosis de vacuna fue administrada al día 20 conteniendo las mismas cantidades de antígeno y adyuvante que la primera dosis. Una segunda muestra de suero post-inmune fue colectada al día 28 por corte de cola. Una tercera, y última dosis de vacuna, fue administrada al día 35 con las mismas cantidades de antígeno y adyuvante que la primera y segunda dosis. Finalmente, la última muestra de suero post-inmune fue colectada al día 43 de iniciado el ensayo por corte de cola y de todos los grupos de ratones (figura 5). Todas las muestras de suero colectadas de cada uno de los 10 ratones por grupo de inmunización fueron mezcladas y tratadas como un pool de suero, y almacenadas a -70°C (Li, et al. 2003).



Para simular una reinfección y estimular la producción de anticuerpos de memoria epítoto específicos, 06 meses después de llevado a cabo el ensayo de 03 dosis, 04 grupos de ratones fueron inoculados intraperitonealmente, por una vez, con el epítoto conjugado químicamente a albúmina de ratón comercial. Los grupos de ratones inoculados fueron: (1) grupo epítoto transplantado en albúmina de ratón, (2) grupo epítoto conjugado a albúmina nativa recombinante, (3) grupo mezcla de epítoto peptídico con albúmina nativa recombinante, y como control, (4) grupo albúmina de ratón comercial. La presencia de éste último grupo control consiste en su utilidad para

detectar la producción de anticuerpos contra albúmina comercial, y separar dicha actividad de aquella que se debe a anticuerpos epítoto específicos únicamente. La vacuna fue preparada como una solución de 10 µg de antígeno con 10 µg de Quil-A® (Brenntag, lyophilized powder). Luego que los 04 grupos de ratones fueron inoculados, se tomó 03 días después una primera muestra de suero post-inmune por corte de cola. Una segunda muestra de suero post-inmune fue tomada 11 días después de la inoculación, por corte de cola. Finalmente, una tercera muestra de suero post-inmune fue tomada 25 días después de la inoculación, por punción cardíaca (figura 6). Para esto último, y con el objetivo de evitar cualquier dolor o estrés innecesario en el animal, el protocolo de eutanasia inició administrando vía intraperitoneal 20 mg/kg de ketamina (Ket-A-10®, sedante) y 5 mg/kg de clorhidrato de xylazina (Dormi-Xy®, analgésico y relajante muscular) que juntos proporcionaron anestesia general al animal. Una vez que el animal fue anestesiado, se le extrajo toda la sangre del corazón mediante punción cardíaca con una jeringa de 10 ml. Luego, por punción cardíaca se administró una sobredosis de pentobarbital sódico (Halatal) en una dosis de 70 mg/kg que en sobredosis produjo un paro cardiorrespiratorio llevando a la muerte del animal (ver anexo 6).



**Figura 6.** Flujograma del esquema de reinfección para la detección de anticuerpos de memoria epítoto específicos, y colección de muestras de suero en los 04 grupos de ratones.

#### **4.9. Ensayo de ELISA indirecto para la detección de anticuerpos epítoto específicos y anticuerpos de memoria epítoto específicos**

Los sueros colectados de los animales inmunizados fueron examinados para determinar la presencia de anticuerpos epítoto específicos utilizando ELISA (Tian, 2001). La reactividad cuantitativa fue registrada en lecturas de Densidad óptica (DO). Se evaluaron 2  $\mu\text{g/ml}$  de concentración de antígeno y una dilución de 1:100 de suero. Estos parámetros permitieron detectar diferencias en la respuesta inmunogénica entre cada antígeno (vacuna) utilizado durante el ensayo de inmunización. Los sueros pre-inmune y post-inmune fueron tratados como un pool de las muestras colectadas de los 10 ratones usados en cada grupo. Cada antígeno fue diluido en buffer carbonato-

bicarbonato (C3041-Sigma). Un volumen de 100  $\mu$ l de antígeno fue agregado a cada pocillo correspondiente en una microplaca de 96 pocillos (Maxisorp Nunc. Thermo Fisher Scientific) Las microplacas fueron incubadas a 4°C durante 18 horas. Cada microplaca fue cubierta con antígeno. Las placas fueron lavadas con 0.05% PBS-Tween 20. Un volumen de 100  $\mu$ l de suero 1:100 con leche sin grasa 3% fue agregado a cada pocillo cubierto de la microplaca e incubadas a 37°C durante 1 hora en un ambiente de cámara húmeda. Las microplacas fueron luego lavadas 5 veces con 200  $\mu$ l de 0.05% PBS-Tween 20. Un volumen de 50  $\mu$ l de conjugado HRP IgG anti-ratón 1:50,000 con leche sin grasa 5% fue agregado a cada pocillo. Las microplacas fueron lavadas 5 veces con 200  $\mu$ l de 0.05% PBS-Tween 20. Un volumen de 50  $\mu$ l de OPD 0.4 mg/ml en buffer fosfato-citrato con perborato de sodio (P4922-Sigma) fue agregado a cada pocillo. Todas las reacciones fueron incubadas 15 minutos a temperatura ambiente protegidas de la luz. Se agregaron 50  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.25 M a cada pocillo para detener la reacción. Todas las reacciones fueron leídas en el lector de placas a 492 nm.

#### **4.10. Análisis Estadístico**

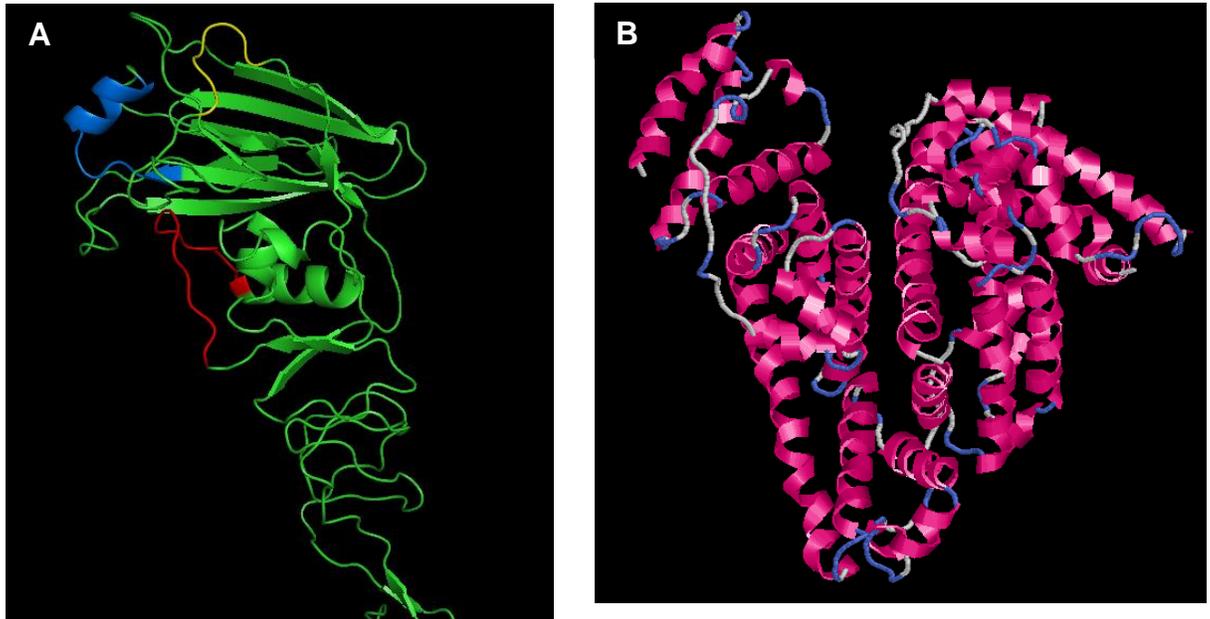
El cálculo del efecto de cada tipo de vacuna en la producción de anticuerpos epítipo específicos y de anticuerpos de memoria fue calculado como proporción de la Densidad óptica (DO post-inmune / DO pre-inmune). Para comparar las diferencias en la proporción de DO, y determinar qué tipo de vacuna generaba una mayor producción significativa de anticuerpos se usó la prueba de hipótesis no paramétrica de Kruskal-Wallis. Para confirmar que las diferencias sean estadísticamente

significativas se aplicó la prueba no paramétrica de suma de rangos de Wilcoxon. Todo el análisis estadístico fue desarrollado con un 5% de significancia, y utilizando el paquete estadístico Stata 16.0

## **V. RESULTADOS**

### **5.1. Determinación de los mejores sitios de trasplante molecular en la albúmina mediante análisis bioinformático**

La estructura predicha de la Hemaglutinina A H3N2 Wuhan 359/95 obtenida por modelamiento por homología, mostró que los 03 epítopes inmunogénicos candidatos eran loops en la proteína viral (figura 7A). Estos epítopes estaban localizados en la superficie de la estructura de la hemaglutinina mostrando orientación al solvente. Otra estructura obtenida por modelamiento por homología fue la albúmina sérica de ratón que mostró un plegamiento en forma de corazón, y constituida por hélices alfa conectadas por loops (figura 7B). Estos loops son considerados los sitios más adecuados para el trasplante de los epítopes en la superficie de la albúmina de ratón.



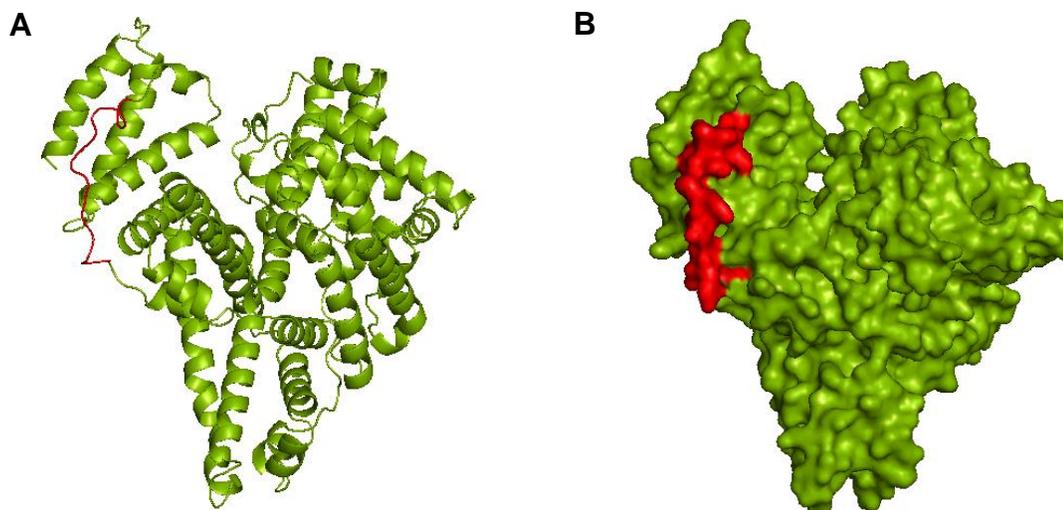
**Figura 7.** (A) Modelo estructural de la hemaglutinina de Influenza A H3N2 Wuhan/359/95. Los 03 epítopes inmunogénicos reportados por Li, 2003; se muestran en rojo (epítope 1), azul (epítope 2) y amarillo (epítope 3). De acuerdo al modelo, se aprecia la estructura secundaria tipo loop y orientación al solvente de los epítopes. (B) Modelo estructural de la albúmina de ratón. La estructura muestra dominios proteicos globulares compuestos por hélices alfa y loops.

Dentro de la estructura de la albúmina sérica de ratón se encontraron tres sitios adecuados con orientación similar a los epítopes de Influenza. Estos sitios eran similares tanto en orientación como en estructura secundaria, lo que ayudo a generar un buen trasplante que no altere la estructura tridimensional de la albúmina, ni su solubilidad. La tabla 1, muestra las 03 regiones en la albúmina sérica de ratón de orientación similar con su respectivo epítope de Influenza.

Epítopes de Hemaglutinina de Influenza A	Región en la albúmina sérica de ratón	Orientación
KAYSNCYPYDVPDY	V492-F508	Similar
HHPSTDSDQTSIY	N266-P281	Similar
WTGVAQD	T556-D564	Similar

**Tabla 1.** Regiones de orientación similar a los epítopes de hemaglutinina de Influenza A en la albúmina de ratón.

Los tres epítopes de Influenza fueron transplantedados en la superficie de la albúmina de ratón de acuerdo a su orientación similar y estructura secundaria. Las estructuras quimera resultantes mostraron que los epítopes conservaron su estructura secundaria tipo loop y su orientación al solvente, lo cual ayudaría a mantener la inmunogenicidad y alcanzar una óptima presentación al sistema inmune durante la circulación (ver anexo 1). La figura 8 (A y B) muestran en rojo al epítopo KAYSNCYPYDVPDY localizado en la albúmina sérica donde se aprecia su estructura secundaria tipo loop y su orientación al solvente. Los otros 2 epítopes de Influenza reportados muestran estructura y orientación similar en la superficie de la albúmina (ver anexo 1).



---

**Figura 8.** Modelo estructural del epítoto de Influenza KAYSNCYPYDVPDY transplantado en la superficie de la albúmina de ratón. (A) Epítoto KAYSNCYPYDVPDY (en rojo) conserva su estructura secundaria de manera apreciable en la superficie de la albúmina de ratón (en verde). (B) La orientación hacia el solvente del epítoto de Influenza se conserva después del trasplante en la superficie de la albúmina de ratón.

### **5.1.1. Modelamiento de optimización del epítoto transplantado en la albúmina de ratón basado en función RAPDF**

Los modelos estructurales iniciales fueron seleccionados de PROTINFO (Hung LH., 2003; Hung LH., 2005), suite RAMP (Universidad de Washington). Para insertar los epítotos en la albúmina sérica de ratón se utilizó el método SEMFOLD (Universidad de Washington). Para la minimización de energía y optimización de las cadenas laterales se utilizó ENCAD (Levitt M., 1995) y SCWRL4 (Kevov GG., 2009), respectivamente. Los modelos fueron evaluados utilizando la puntuación RAPDF, y el mejor modelo fue seleccionado.

Se escogió la secuencia de los 03 epítotos inmunogénicos de Influenza A y se generaron dos modelos de la secuencia de cada epítoto. En un primer modelo, se incluyó un aminoácido adyacente a la secuencia lineal del epítoto sin alterar la estructura lineal como tal. En un segundo modelo, se consideró únicamente la secuencia de aminoácidos de cada epítoto inmunogénico sin incluir aminoácidos adicionales (tabla 2).

Número de modelo	Secuencia del Epítotope
Epítotope 1	KAYSCNCYPYDVDPYA
Epítotope 2	VHHPSTDSDQTSIY
Epítotope 3	NWTGVAQD
Epítotope 4	KAYSCNCYPYDVDPY
Epítotope 5	HHPSTDSDQTSIY
Epítotope 6	WTGVAQD

**Tabla 2.** Nombre del modelo evaluado de epítotope insertado y su respectiva secuencia lineal de aminoácidos.

Se evaluaron todos los modelos generados insertados en las mismas posiciones indicadas en la tabla 1 para demostrar si se generaba un gran cambio de energía durante el análisis de cada modelo. Se obtuvieron archivos PDB de los modelos de albúmina transplantada optimizados de acuerdo a la función RAPDF. Las tablas 3 y 4 muestran cada modelo en albúmina sérica de ratón y humano, respectivamente, y con su respectiva puntuación RAPDF que refleja que tan energéticamente favorable es cada conformación. Mientras más negativa la puntuación RADPF, más favorable a nivel energético es la posible estructura.

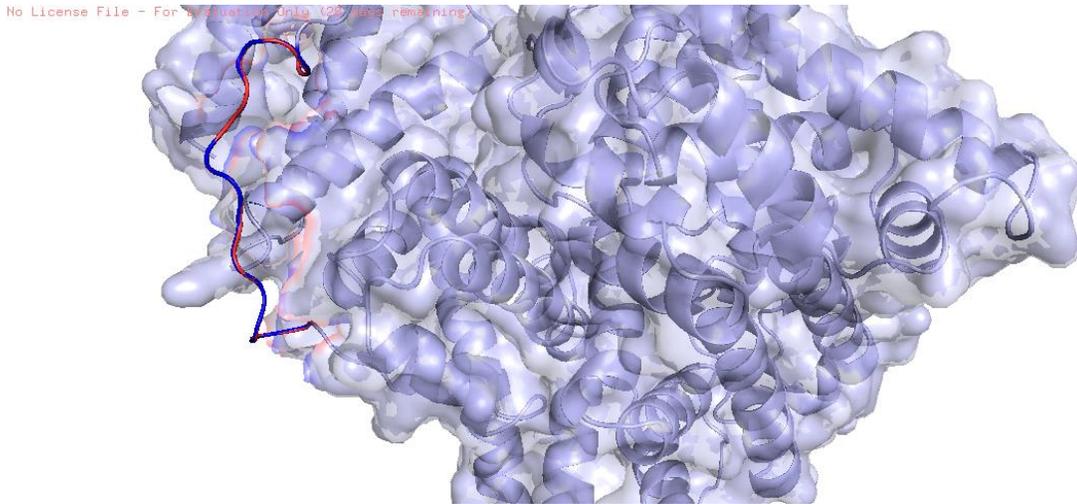
Modelo PDB	Puntuación RAPDF
Epítotope4	-26400.22
Epítotope3	-26333.25
Epítotope2	-26330.7
Epítotope6	-26311.18
Epítotope1	-26211.07
Epítotope5	-25989.56
MSA	-25671.83

**Tabla 3.** Puntuaciones RAPDF de los modelos en albúmina sérica de ratón (MSA). También, se observa la puntuación RAPDF del modelo de albúmina de ratón como control.

PDB Model	RAPDF score
Epitope6	-27076.99
Epitope4	-26875.14
Epitope1	-26839.32
Epitope3	-26822.82
Epitope5	-26525.83
Epitope2	-26253.92
1n5u(HSA)	-26765.47

**Tabla 4.** Puntuaciones RAPDF de los epítopes insertados en albúmina sérica humana cristalizada (HSA). También, se observa la puntuación RAPDF de la albúmina humana cristalizada como control.

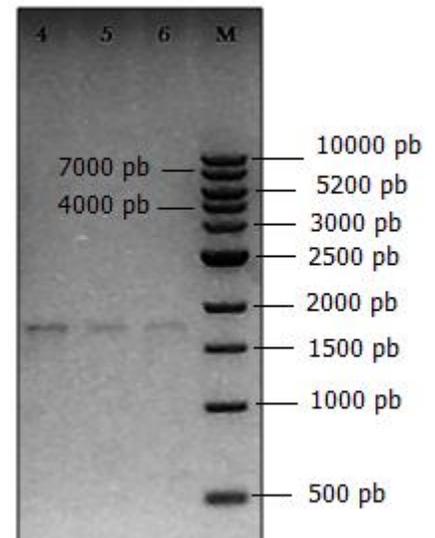
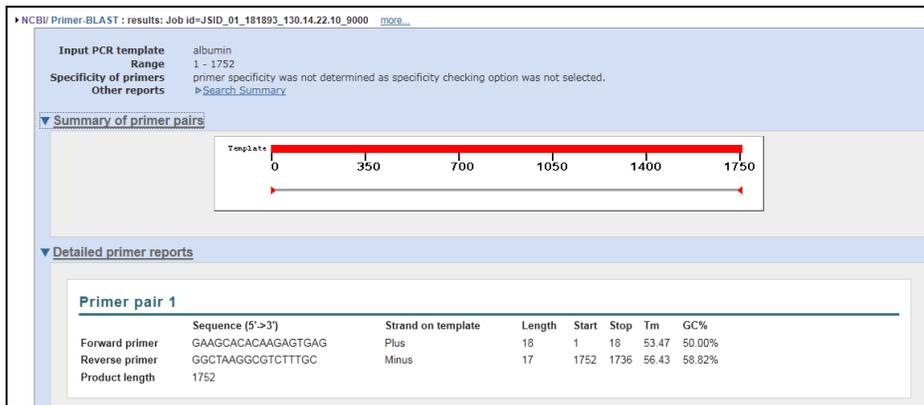
Basándose en los resultados obtenidos, el modelo epítope 4 en la albúmina sérica de ratón podría ser un candidato adecuado para la evaluación experimental, debido a que sería lo suficientemente estable para ser sintetizado en el laboratorio. Contrariamente, el modelo epítope 5 sería un mal candidato para evaluación experimental de acuerdo a la puntuación RAPDF asignada (ver tabla 3). Se seleccionó el modelo epítope 4 como candidato para síntesis experimental, donde el epítope KAYSCNCYPYDVPDY se encuentra insertado en la posición 494-508 de la albúmina sérica de ratón (figura 9).



**Figura 9.** Superposición estructural de la albúmina nativa de ratón (en rojo) con la albúmina de ratón con epítipo de Influenza A KAYSNCYPYDVPDY transplantado en la posición 494-508 (en azul).

## **5.2. Producción de una albúmina de ratón recombinante nativa y transplantada con epítipes inmunogénicos de la hemaglutinina del virus Influenza A en su superficie.**

Se amplificó el gen de albúmina de ratón a partir de la extracción de ARNm de albúmina del hígado de un ratón, y se realizó la retrotranscripción del ARNm. El cDNA obtenido fue amplificado usando los cebadores específicos. El producto de amplificación obtenido tenía un peso molecular de 1752 pb, de acuerdo a lo reportado por el análisis en NCBI Primer BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (figura 10).



M = marcador 1kb (3µl)

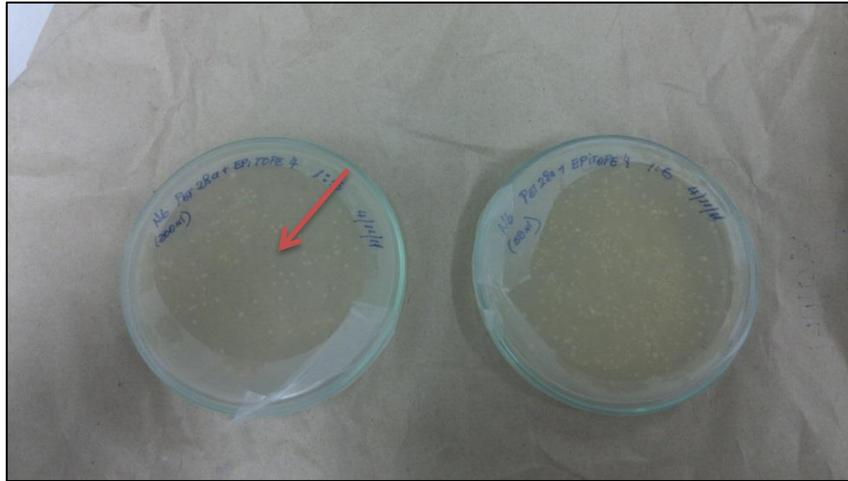
4 = fragmento 1752pb - 1µl de muestra + 4 agua + 1 sample 6x

5= fragmento 1752pb - 1µl de muestra + 4 agua + 1 sample 6x

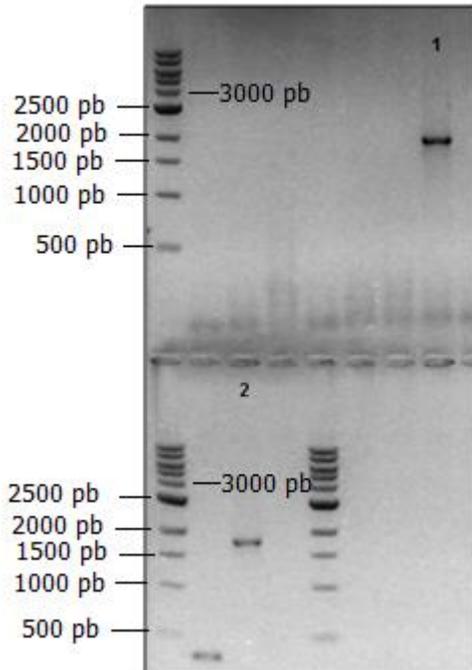
6= fragmento 1752pb - 1µl de muestra + 4 agua + 1 sample 6x

**Figura 10.** (Izquierda) Resultado del peso molecular esperado para el gen de albúmina por PCR, mediante análisis en Primer BLAST. (Derecha) Electroforesis en gel de agarosa 0.8% del fragmento de 1752 pb obtenido a partir de la amplificación del cDNA de albumina por PCR convencional.

Se transformaron las bacterias *E.coli* Novablue con el producto de PCR del gen de albúmina de ratón y se incubaron según se indica en Metodología 4.2.2 (figura 11). Se seleccionaron algunas colonias de la placa de agar LB y mediante PCR de colonia se seleccionó a aquellas colonias transformadas exitosamente con el constructo Pet28a + inserto 1752pb. Estas colonias de transformación exitosa presentaron una banda de 1752pb por PCR de colonia (figura 12).

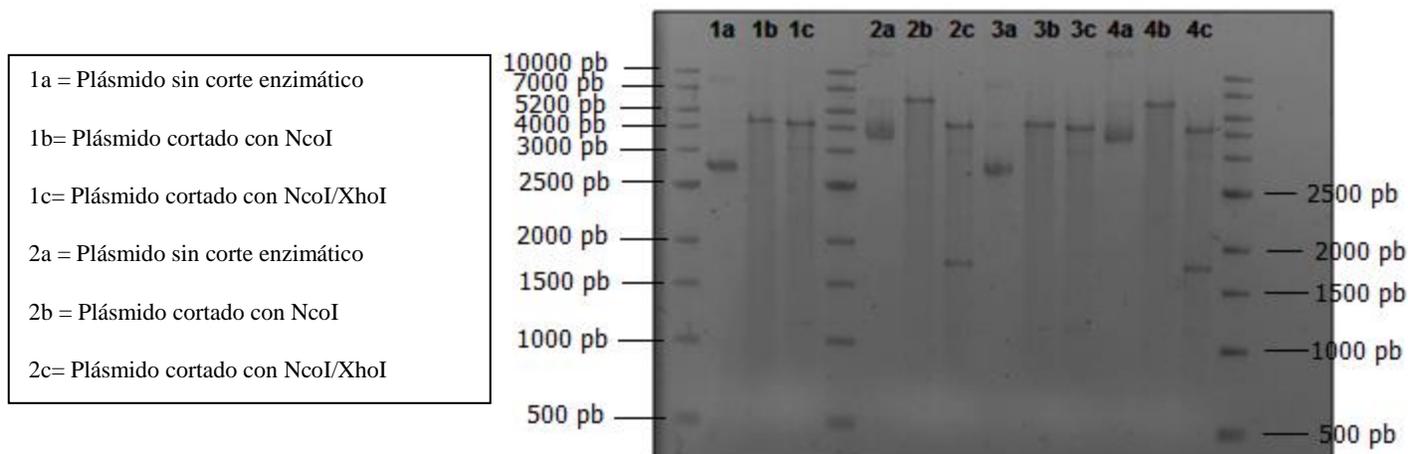


**Figura 11.** Colonias de *Escherichia coli* Novablue en agar LB mas kanamicina. (Izquierda) las colonias crecieron después de ser transformadas con la ligación 1:5 usando 200µl de células competentes. (Derecha) las colonias crecieron después de ser transformadas con la ligación 1:5 usando 50µl de células competentes. La flecha señala una colonia *Novablue* característica de borde redondeado y de color perla.



**Figura 12.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de los productos de amplificación provenientes de PCR de colonias Novablue. Colonias 1 y 2 positivas para la presencia de constructo Pet28a + inserto 1752pb.

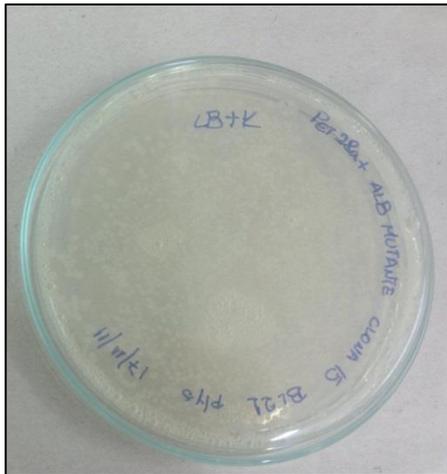
La digestión enzimática de los plásmidos extraídos de las colonias que dieron positivo para el fragmento de 1752pb por PCR de colonia permitió descartar falsos positivos de aquellas colonias que realmente contenían el gen. En las muestras 2b y 2c que corresponden al plásmido cortado con la enzima NcoI, y NcoI + XhoI, respectivamente, se observa una diferencia de peso notoria por la liberación del inserto de 1752pb; esta diferencia de peso no puede observarse en la muestra 1b y 1c que corresponde a un plásmido sin inserto (figura 13).



**Figura 13.** Electroforesis en gel de agarosa 0.8% de 4 plásmidos extraídos de colonias positivas para el fragmento 1752 pb insertado. Puede observarse que para la muestra 2 y 4 se logró liberar el inserto de 1752pb mediante digestión enzimática del plásmido.

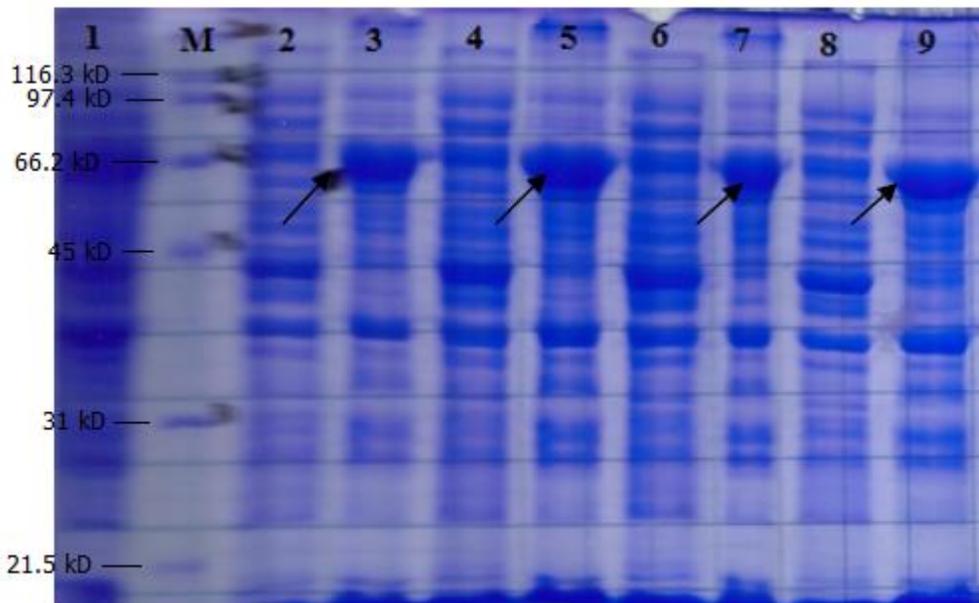
### 5.2.1. Expresión del gen de albúmina

Las células BL21 (DE3) competentes fueron transformadas únicamente con los plásmidos extraídos y positivos para la presencia del inserto de albúmina. De estos plásmidos, sólo 2 fueron elegidos para esta transformación (figura 14).



**Figura 14.** Colonias de *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS transformadas con el constructo Pet28a + albúmina madura. La fotografía corresponde a una placa de LB con kanamicina donde se observa el crecimiento de las colonias de *E.coli* BL21 transformadas con uno de los plásmidos positivos.

Una vez que se observó el crecimiento de las colonias de *E. coli* BL21, se indujo la expresión del gen de albúmina para observar el nivel de producción de la proteína. La electroforesis SDS-PAGE 12% de la fracción soluble e insoluble del homogenizado evidenció que la proteína se encontraba en su mayoría en la fracción insoluble (figura 15).

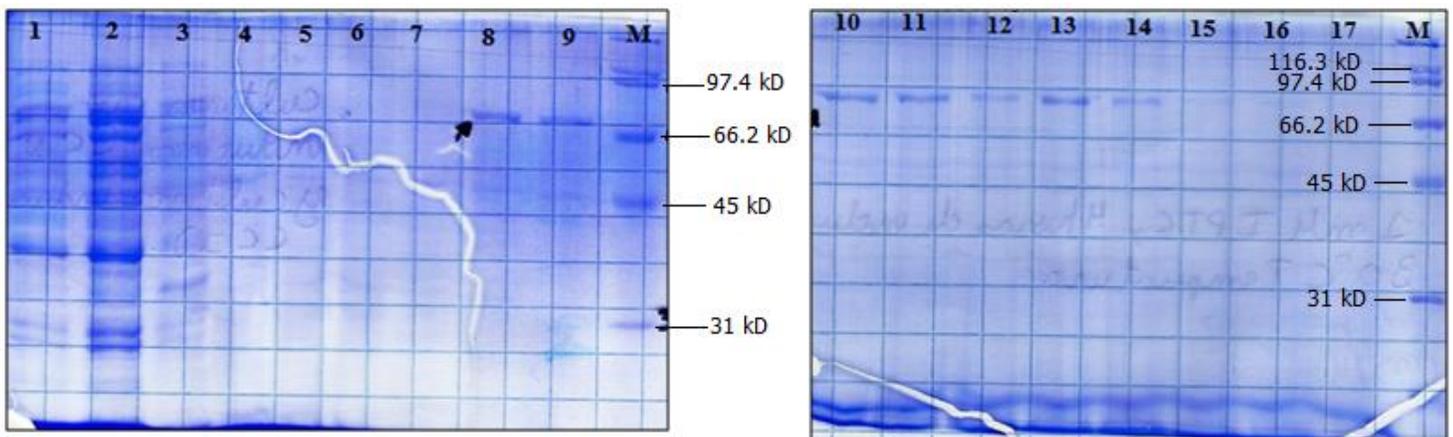


- 1 mM IPTG (30°C)
- 1 = alb E4 inducción a 4 horas.
  - 2 = alb E4 fracción soluble a 4 horas
  - 3 = alb E4 fracción insoluble a 4 horas
  - 4 = alb E4 fracción soluble a 4 horas (repetición)
  - 5 = alb E4 fracción insoluble a 4 h (repetición)
  - 6 = alb E4 fracción soluble a 4 h (repetición 2)

**Figura 15.** SDS-PAGE 12% de las muestra alb E4 (albúmina con epítoto 4 transplantado en su superficie). M = marcador de peso molecular Broad Range (Bio Rad). Las flechas en negro señalan la banda de proteína expresada que coincide con el peso molecular de 67 kDa de la albúmina de ratón.

### 5.2.2. Purificación de la albúmina de ratón

Durante el proceso de purificación se observó que la proteína albúmina transplantada, pudo ser eluida a concentraciones de imidazol de 60 mM, 100mM, y 300 mM de buffer fosfato + 8M urea, pH 7.4. Lo que significa, que la proteína recombinante presenta la cola de histidinas que le permite unirse eficientemente a la columna revestida con níquel, pero existe una determinada concentración de imidazol (60 mM a 300 mM) a la que el competidor desplaza a la proteína unida y permite lograr su elución en las fracciones descritas anteriormente (figura 16).



**Figura 16.** SDS-PAGE 12% de las fracciones colectadas durante el proceso de purificación de la fracción insoluble por cromatografía de afinidad usando una columna His-Trap Chelating 5 ml. La flecha negra muestra una banda que coincide con el peso molecular de 67 kDa de la albúmina de ratón.

Fracción 1 = eluido

Fracción 2-6 = Buffer 20 mM imidazol

Fracción 7-9 = Buffer 60 mM imidazol

Fracción 10-12 = Buffer 100 mM imidazol

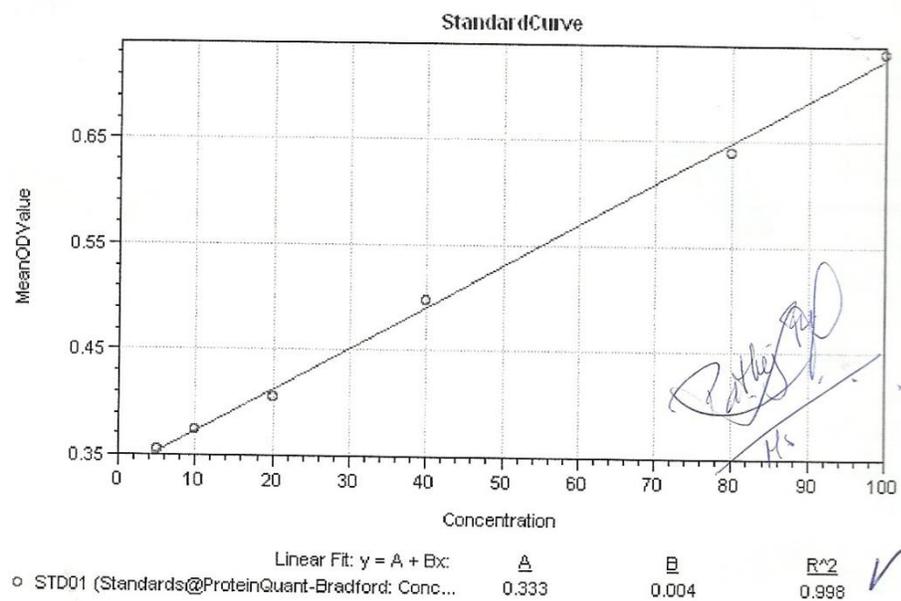
Fracción 13-17 = Buffer 300 mM imidazol

### 5.2.3. Método de Bradford para cuantificación de la proteína purificada

Para la cuantificación de la proteína concentrada utilizando el sistema AMICON®, se realizó un ensayo de Bradford incluyendo como proteína estándar albúmina sérica bovina (BSA) a diferentes concentraciones. El ensayo arrojó una concentración de 2,059 µg/ml  $\approx$  2mg/ml de albúmina de ratón en cada tubo colectado (figura 17).

Unknowns										
Sample	Wells	OD_Values	Concentration	MeanConc	SD	CV	Dilution	AdjConc	uM_pncA	
alb.100	A3	0.401 ✓	17.178	18.117	1.328	7.3	100.0	1811.659	87.431	
	A4	0.408 ✓	19.055							
alb.200	B3	0.365 ✓	8.017	9.007	1.400	15.5	200.0	1801.381	86.935	
	B4	0.373 ✓	9.997							
alb.25	G1	0.819 ✓	123.195	125.936	3.876	3.1	25.0	3148.391	151.942	
	G2	0.840 ✓	128.676							
alb.50	H1	0.526 ✓	48.897	51.269	3.355	6.5	50.0	2563.462	123.713	
	H2	0.545 ✓	53.642							

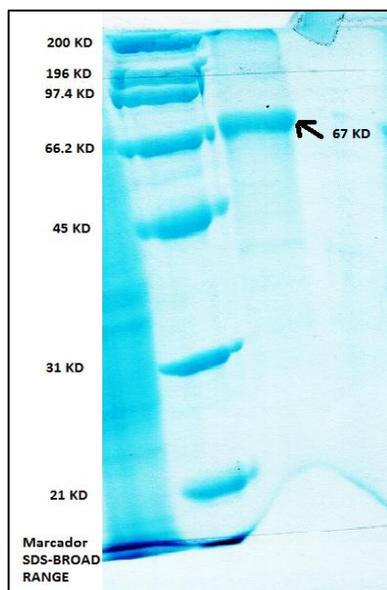
Standards (µg/ml)							
Sample	Concentration	BackCalcConc	Wells	OD_Values	MeanODValue	SD	CV
St1	5.000	6.393	A1	0.358	0.355	0.004	1.2
			A2	0.352			
St2	10.000	9.794	B1	0.372	0.374	0.003	0.7
			B2	0.376			
St3	20.000	16.315	C1	0.397	0.404	0.010	2.4
			C2	0.411			
St4	40.000	41.005	D1	0.495	0.498	0.005	1.0
			D2	0.502			
St5	80.000	76.048	E1	0.633	0.639	0.009	1.5
			E2	0.646			
St6	100.000	94.978	F1	0.707	0.733	0.036	4.9
			F2	0.758			



**Figura 17.** Ensayo de Bradford para cuantificación de proteínas y curva estándar.

### 5.3. Método de replegamiento de la albúmina de ratón concentrada

Tras finalizar el ensayo de solubilización se pudo comprobar por electroforesis SDS-PAGE 12% que en la solución de buffer 20mM Tris-HCl, pH 8.0 se encontró la presencia de proteína que coincide con el peso molecular de la albúmina (67 kDa). Este ensayo demostró que ahora la albúmina de ratón recombinante se encontraba soluble en solución. El ensayo de Bradford determinó que la concentración de la albúmina solubilizada era de 0.320 mg/ml (figura 18).



**Figura 18.** SDS-PAGE 12% de las muestra de albúmina de ratón solubilizada después de haberse retirado la urea por ultrafiltración durante el ensayo de repliegamiento.

#### **5.4. Determinación por absorción atómica de la actividad de la albúmina de ratón replugada a partir de la medida de la capacidad transportadora de zinc**

Para demostrar cuanta proteína se encuentra bien plegada en la solución buffer sin urea, se analizó la capacidad transportadora de la albúmina presente en la solución por absorción atómica.

Luego de preparar soluciones de cloruro de zinc a 0.004 mM, 0.008 mM, 0.012 mM, 0.016 mM, y 0.02 mM para la curva de calibración, se calculó su absorbancia y se revisó la concentración de cada solución por absorción atómica (tabla 5).

<b>Cloruro de Zinc (mM)</b>	<b>Absorbancia</b>
0.004	0.109
0.008	0.211
0.012	0.316
0.016	0.410
0.02	0.486

**Tabla 5.** Absorbancia del zinc en las distintas soluciones de cloruro de zinc de la curva de calibración.

La tabla 6 muestra que el resultado de la retención de zinc por el sistema de ultrafiltración sin la intervención de la albúmina fue de 3.96% del zinc inicial. Este valor en mM fue restado del valor del cambio en la concentración de zinc obtenido en los experimentos con la proteína.

<b>Prueba de retención por sistema de ultrafiltración</b>			
<b>Muestra</b>	<b>Absorbancia</b>	<b>ppm</b>	<b>mM</b>
Inicial	0,0123	0,140625	0,00215089
Eluído	0,0118	0,13504464	0,00206553
<b>Diferencia de retención</b>	-	0,005580357	0,00008536
<b>Diferencia (%)</b>	-	-	3,96

**Tabla 6.** Retención de zinc por el sistema de ultrafiltración.

### **5.5. Determinación de la eficiencia del replegamiento de la albúmina**

La eficiencia del proceso de replegamiento se analizó a través de una prueba de captura zinc. El resultado de la concentración de zinc en presencia de la proteína albúmina (transplantada y nativa) fue comparado con los valores obtenidos para la albúmina nativa de origen comercial, evidenciando que se logró un 100% y 82% de

eficiencia de replegamiento para la albúmina nativa recombinante y albúmina transplantada, respectivamente. Así mismo, se ejecutó un ensayo de captura de zinc en presencia de albúmina recombinante en urea, solución en la que la albúmina no se encontraría correctamente plegada, y se observó que la eficiencia de replegamiento en esta proteína fue de 0.00 % (tabla 7).

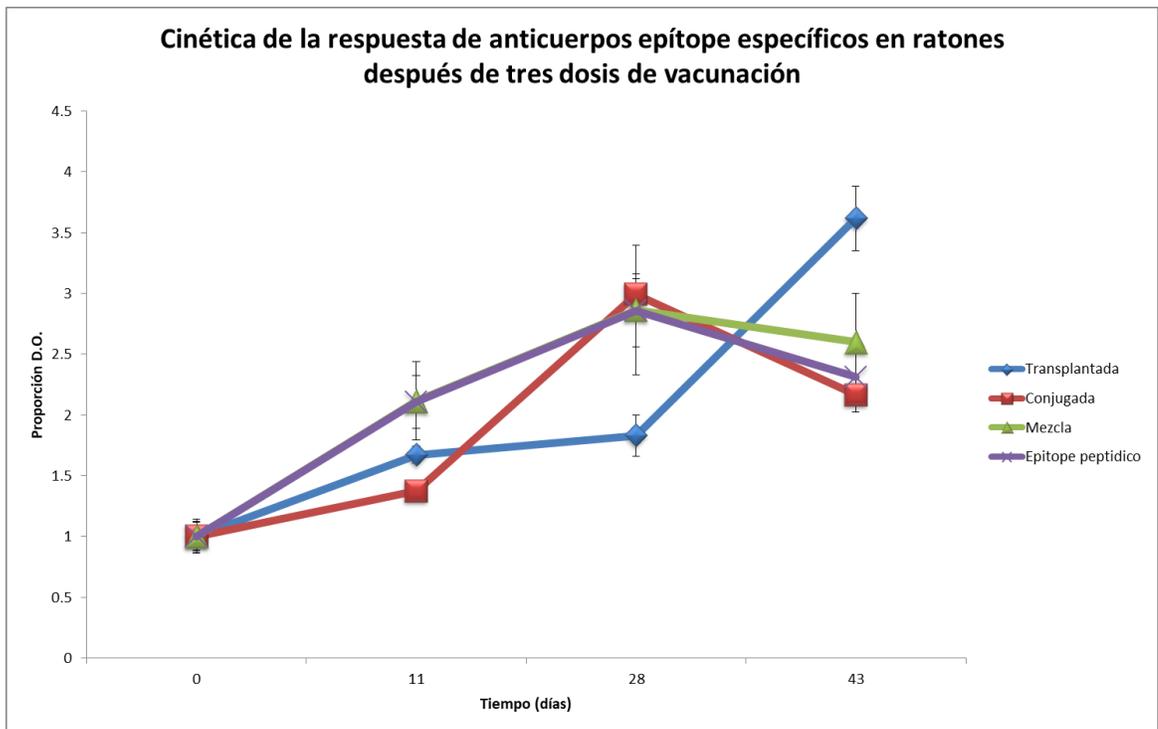
<b>Eficiencia del replegamiento de albúmina transplantada y albúmina nativa</b>				
<b>Tipo de muestra</b>	Retención de zinc según tipo de proteína (mM)	Concentración de proteína (mM)	Eficiencia de replegamiento (valor de $\beta$ cuando $\alpha$ es 1)	Valor real (comparado a albúmina comercial)
<b>Albúmina comercial</b>	0.000466	0.000554	0.84	100 %
<b>Albúmina nativa recombinante</b>	0.0004654	0.000554	0.84	100 %
<b>Albúmina recombinante no plegada (en urea)</b>	0.000000	0.000909	0.00	0.00 %
<b>Albúmina transplantada</b>	0.000382	0.000554	0.69	82%

**Tabla 7.** Cálculo de la eficiencia de replegamiento de la albúmina con epítoto transplantado en su superficie y albúmina nativa recombinante.

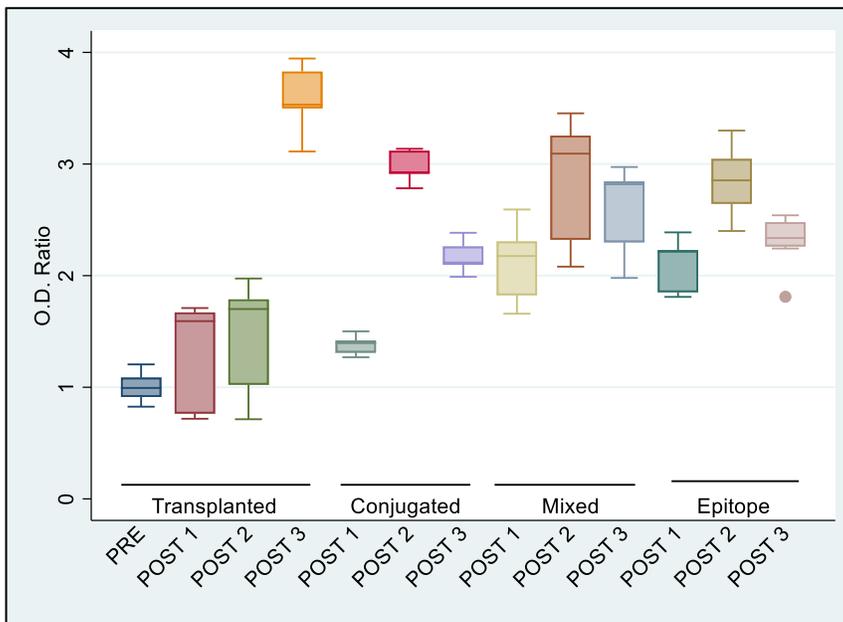
### **5.6. Cinética de la respuesta de anticuerpos epítoto específicos en ratones después de la inmunización con tres inoculaciones de vacuna**

La figura 19 muestra que después de completado el ensayo de tres inoculaciones de cada tipo de vacuna, y según el grupo de inmunización, se observa una elevación de la respuesta de anticuerpos epítoto específicos. Esta respuesta se muestra como el promedio de la proporción de D.O. Después de la primera dosis de vacuna, se observa

un aumento significativo en la producción de anticuerpos epítoto específicos en el grupo que recibió la mezcla de epítoto con albúmina y en el grupo que recibió la solución de epítoto peptídico solamente (figura 20). No se observó diferencia significativa en el incremento visto para los grupos que recibieron albúmina con epítoto transplantado y epítoto conjugado a albúmina. Después de la segunda inoculación, todos los grupos de vacunación excepto el grupo que recibió epítoto transplantado en albúmina registraron un nuevo aumento significativo en la producción de anticuerpos. Los grupos que recibieron epítoto conjugado a albúmina (proporción D.O = 2.992), mezcla de epítoto con albúmina (proporción D.O = 2.864), y epítoto peptídico (proporción D.O = 2.858) mostraron niveles similares de producción de anticuerpos específicos (figura 19). Sorpresivamente, después de la tercera inoculación de la vacuna, todos los grupos excepto el grupo que recibió epítoto transplantado en albúmina mostraron un descenso en la producción de anticuerpos. Tras la tercera inoculación el grupo que recibió epítoto transplantado en albúmina mostró un incremento significativo de la producción de anticuerpos (proporción D.O = 3.616). Este incremento en la producción de anticuerpos es estadísticamente significativo al compararse con lo registrado en los grupos epítoto conjugado (proporción D.O = 2.164), mezcla de epítoto con albúmina (proporción D.O. = 2.596), y epítoto peptídico (proporción D.O = 2.313) (figura 20).



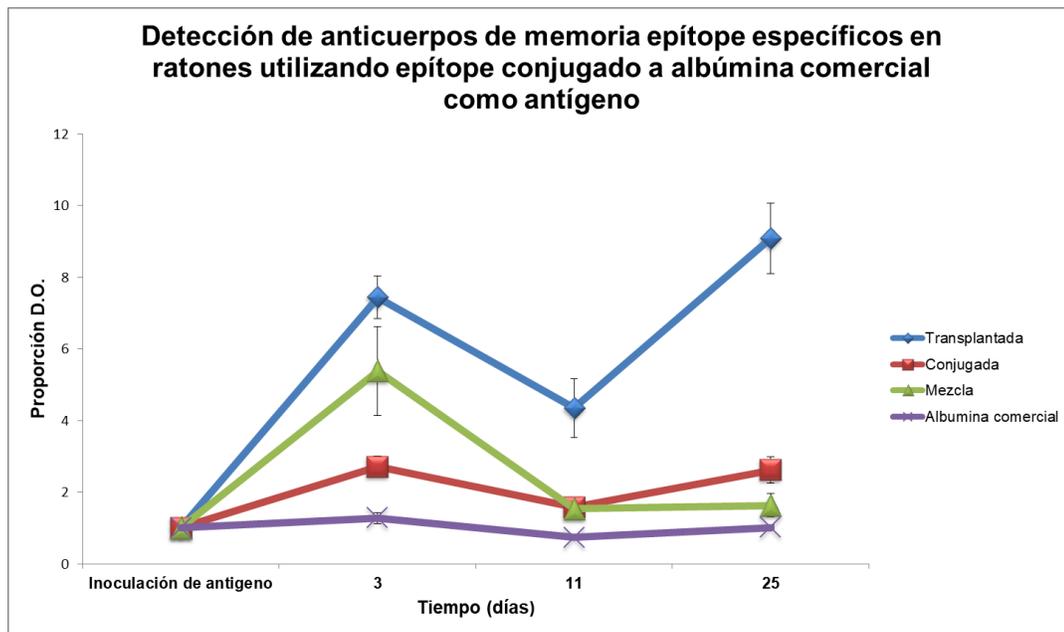
**Figura 19.** Cinética de la respuesta de anticuerpos epítoto específicos en ratones después de las tres dosis de vacuna en un periodo de 43 días. El valor de la proporción de D.O. para el suero pre-inmune es 1. Los valores de suero post-inmune en el gráfico están representados como promedio de la proporción de D.O. (post-inmune/pre-inmune) obtenidos para cada muestra de suero colectado en tres momentos diferentes.



**Figura 20.** Diagrama de caja de la diferencia de proporción de D.O. entre los grupos de vacunación en un periodo de 43 días.

Se simuló un evento de reinfección con el epítotope de influenza que logró estimular la producción de anticuerpos de memoria. Tres días después que el epítotope conjugado a albúmina comercial fue inoculado como antígeno en 04 grupos de ratones (albúmina transplantada; albúmina conjugada; albúmina mezclada; y albúmina comercial), se observó un incremento significativo en la producción de anticuerpos de memoria en el grupo que recibió epítotope transplantado en albúmina. Este incremento fue significativamente mayor comparado a lo observado en el grupo que recibió epítotope conjugado a albúmina, mezcla de epítotope con albúmina, y albúmina comercial (figura 21). Un aumento significativo de la producción de anticuerpos de memoria también se observó en el grupo vacunado con la mezcla de epítotope con albúmina (proporción D.O. = 5.386) comparado a los grupos epítotope conjugado y albúmina comercial (figura 21). Sorpresivamente, después de 11 días de la inoculación se observó una disminución en la producción de anticuerpos de memoria en todos los 04 grupos. A pesar de ello, el mayor nivel de anticuerpos de memoria se mantuvo en el grupo epítotope transplantado en albúmina, mientras que el nivel de anticuerpos en el grupo epítotope mezclado con albúmina disminuyó a un nivel similar al visto en el grupo epítotope conjugado (figuras 21 y 22). En el día 25 del ensayo, se observó un nuevo incremento en el nivel de anticuerpos de memoria en el grupo epítotope transplantado a albúmina. Este aumento fue significativamente mayor al visto después de 3 días de iniciado el ensayo en este grupo de ratones y en los otros tres grupos de vacunación. También, se observó un ligero aumento en la producción de anticuerpos de memoria en el grupo epítotope conjugado a albúmina, similar al visto a los 03 días de iniciado el ensayo (figura 22). La figura 23 muestra que no hay diferencia significativa en la

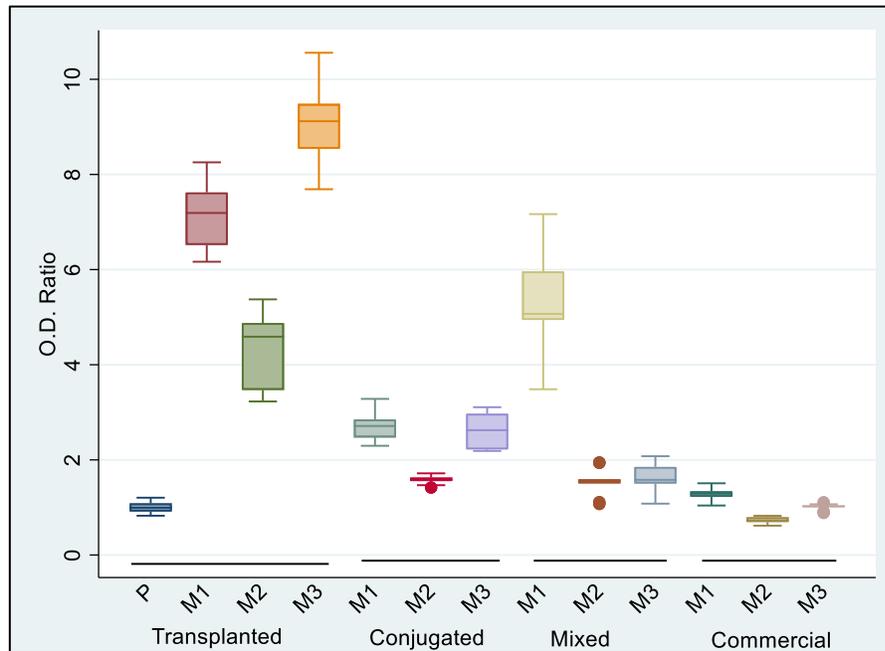
respuesta de anticuerpos entre el suero pre-inmune (proporción D.O = 1.0) y el suero tomado a los 25 días de iniciado el ensayo (proporción D.O = 1.01) en el grupo de ratones que recibió albúmina comercial, lo que indicaría que no hay presencia significativa de anticuerpos anti-albúmina, por lo que la respuesta de anticuerpos visto en los otros grupos de ratones podría ser epítoto específica.



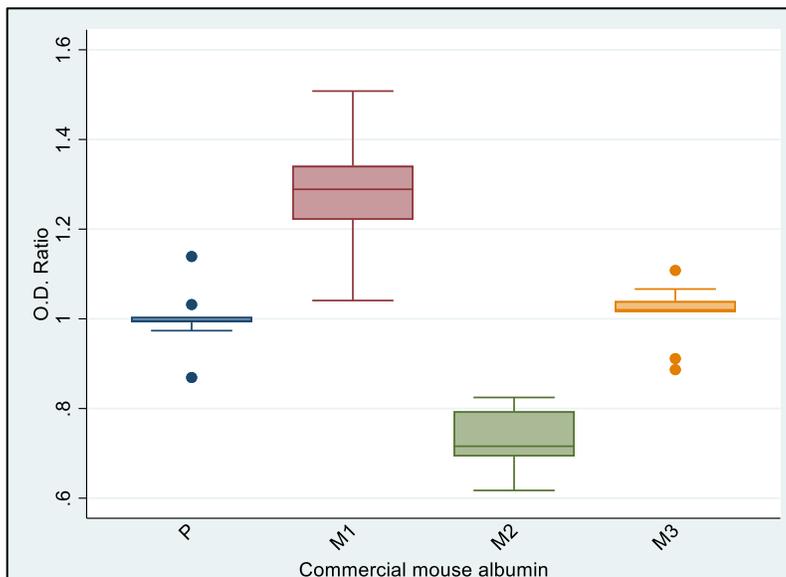
**Figura 21.** Cinética de la producción de anticuerpos de memoria epítoto específicos en el ensayo de 25 días después de una única dosis de antígeno.

La inclusión de cola de histidinas en proteínas recombinantes candidatas a vacunas puede afectar su inmunogenicidad en ratones pero este efecto varía dependiendo de la proteína (Khan, 2012). En este sentido se enfrentó el antisero (suero post-inmune) de los grupos de ratones inmunizados con tres dosis de epítoto transplantado en albúmina recombinante; epítoto conjugado a albúmina recombinante; epítoto mezclado con albúmina recombinante; y epítoto sólo, a una proteína de naturaleza

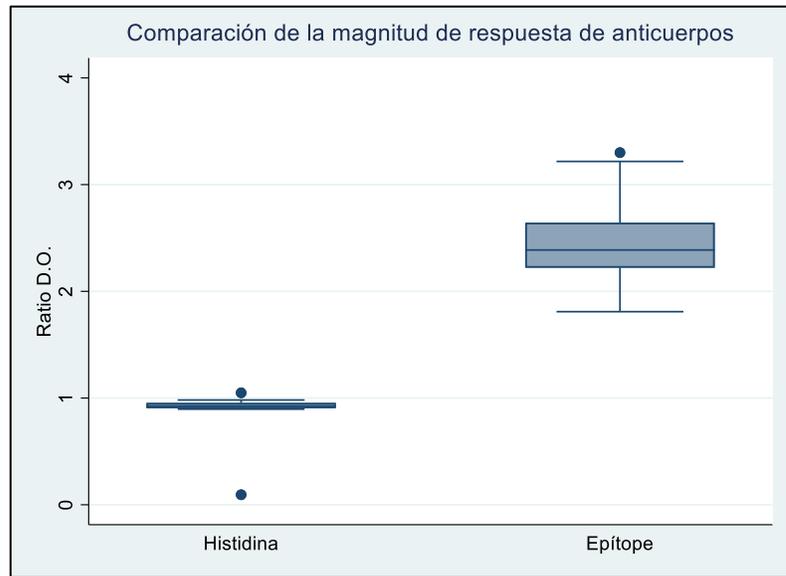
recombinante con cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal como la pirazinamidasa (PZA<sub>s</sub>) de *Mycobacterium tuberculosis* H37RV. Se comparó el nivel de anticuerpos específicos antihistidinas y antiepítotope en los antisueros, y también en los antisueros obtenidos del ensayo de reinfección y memoria para evaluar el efecto de la cola de histidinas en la respuesta de anticuerpos mediada por el epítotope presentado por la albúmina recombinante como inmunógeno. Se observó la presencia de anticuerpos anti-cola de histidina en todos los antisueros de los grupos de ratones que fueron inmunizados con una forma de albúmina recombinante. Sin embargo, no se observó la presencia de anticuerpos antihistidina en el antisuero de los ratones inmunizados solo con el epítotope (figura 24). Al comparar el nivel de anticuerpos específicos producidos contra las histidinas y contra los epítotos en los diferentes antisueros de los ratones inmunizados con tres dosis, se observó diferencia estadísticamente significativa entre la magnitud de anticuerpos antihistidinas y el nivel de anticuerpos antiepítotope en los antisueros de los ratones inmunizados con epítotope conjugado a albúmina recombinante y epítotope mezclado con albúmina recombinante, favoreciendo a los anticuerpos antihistidinas (figuras 25 y 26). Contrariamente se observó que no había diferencia estadísticamente significativa entre la magnitud de anticuerpos antihistidina y antiepítotope en el antisuero de los ratones inmunizados con tres dosis de epítotope transplantado en albúmina recombinante (figura 27).



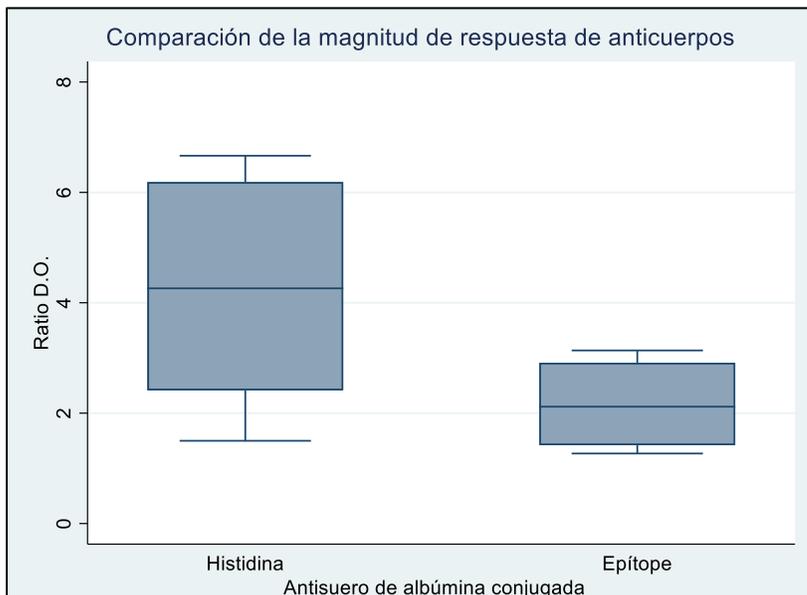
**Figura 22.** Diagrama de caja de las muestras de suero después de 3 días, 11 días y 25 días de administrada la dosis única de antígeno en los 04 grupos de ratones. Se muestra la proporción de D.O. para la muestra de suero pre-inmune (P), muestra post-inmune después de 3 días (M1), después de 11 días (M2) y después de 25 días (M3). El grupo epítoto transplantedo en albúmina mostró un aumento en la producción de anticuerpos de memoria significativamente mayor (proporción D.O. = 7.106) que el visto en el grupo epítoto conjugado (proporción D.O. = 2.706), el grupo epítoto mezclado (proporción D.O. = 5.386), y el grupo que recibió albúmina comercial (proporción D.O. = 1.284) después de 03 días de administrada la dosis única de antígeno. A pesar del descenso en la respuesta de anticuerpos después de 11 días de administrada la dosis única de antígeno en el grupo epítoto transplantedo (proporción D.O. = 4.347), se registró nuevo incremento en la respuesta al día 25 de administrada la dosis única de antígeno (proporción D.O. = 9.086). El grupo epítoto conjugado registró un ligero aumento al día 25 (proporción D.O. = 2.617). Todos los sueros pre-inmunes de los 4 grupos de vacunación registraron una proporción D.O. = 1.0 (aquí se muestra el valor correspondiente al grupo epítoto transplantedo).



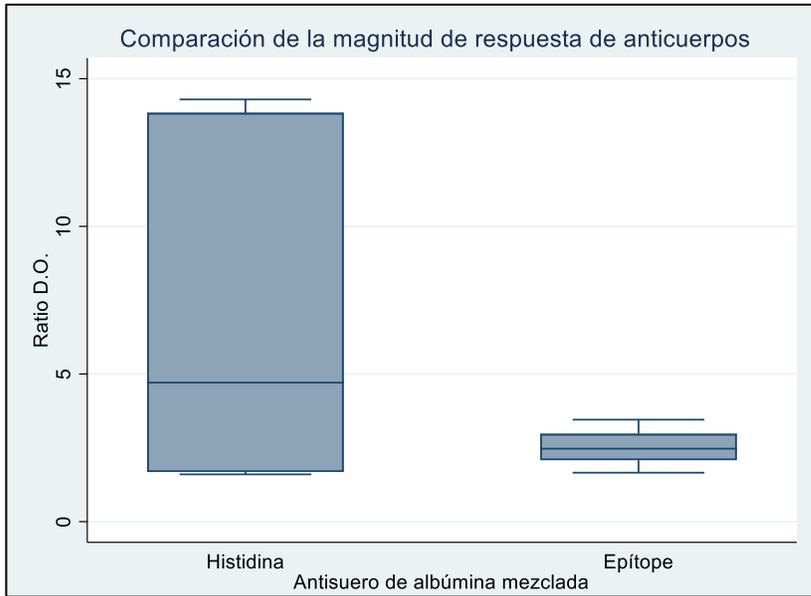
**Figura 23.** Diagrama de caja de la respuesta de anticuerpos anti-albúmina en el grupo que recibió albúmina comercial. No se observó diferencia significativa en la proporción de D.O. entre el suero pre-inmune y post-inmune después de 25 días de administrada la dosis única de antígeno.



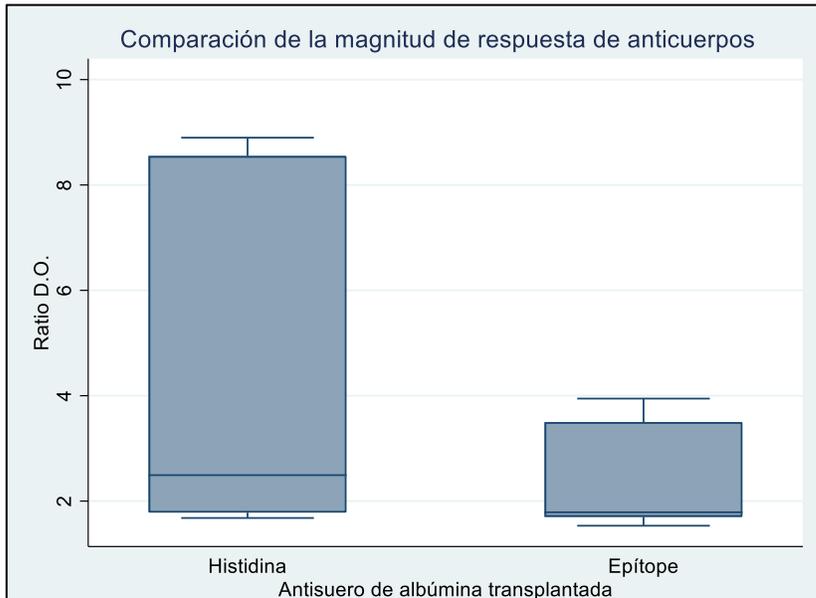
**Figura 24.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos anti-histidina y anti-epítoto en el antisuero de los ratones inmunizados con tres dosis del epítoto peptídico. No se observa presencia de anticuerpos anti-histidina en el antisuero de los ratones.



**Figura 25.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos anti-histidina y anti-epítoto en el antisuero de los ratones inmunizados con tres dosis del epítoto conjugado a albúmina recombinante.

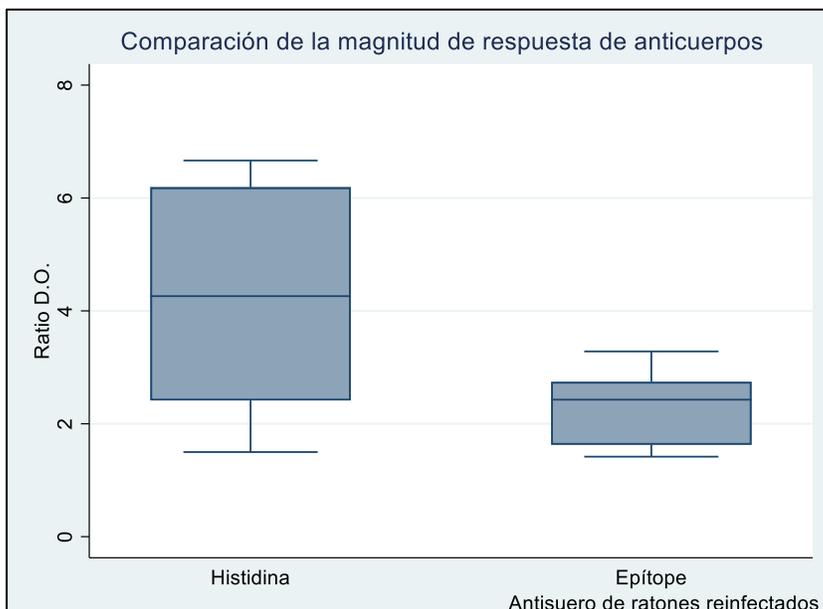


**Figura 26.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos anti-histidina y anti-epítotope en el antisuero de los ratones inmunizados con tres dosis del epítotope mezclado con albúmina recombinante

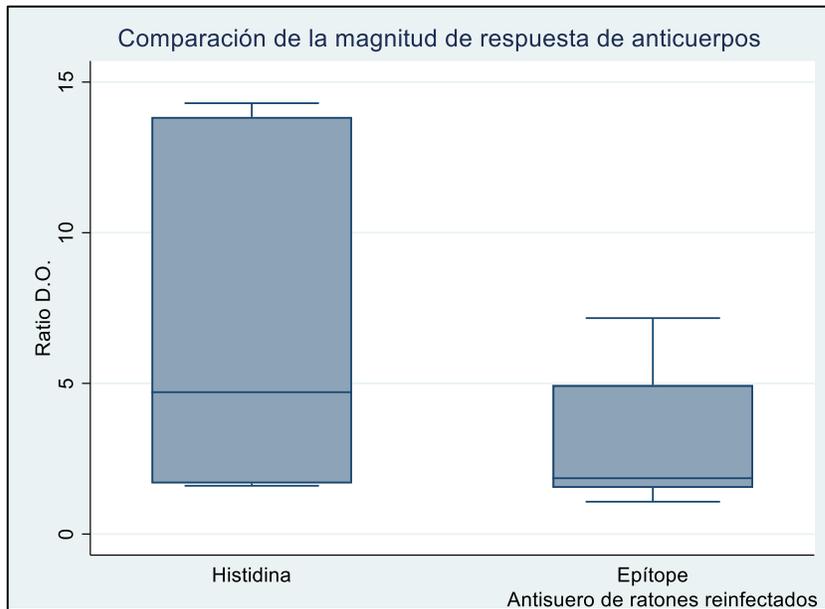


**Figura 27.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos anti-histidina y anti-epítotope en el antisuero de los ratones inmunizados con tres dosis del epítotope transplantedo en albúmina recombinante.

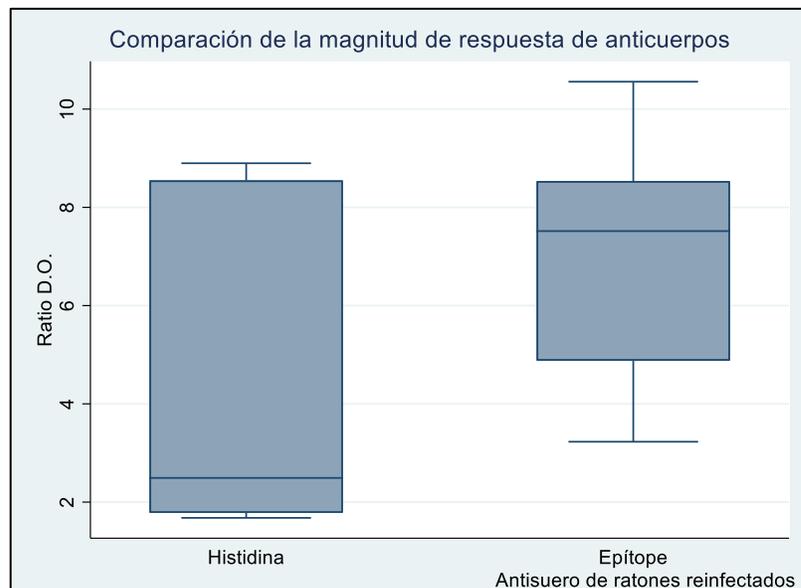
Al comparar la magnitud previamente registrada de anticuerpos antihistidina con la magnitud de anticuerpos antiépítope de memoria presentes en el antisero de los ratones que fueron re infectados con epítoto conjugado a albúmina comercial sin cola de histidinas, y que previamente recibieron tres dosis de epítoto con una forma de albúmina recombinante, se observó una diferencia estadísticamente significativa favoreciendo a la magnitud de anticuerpos anti-histidina por sobre la de anticuerpos anti-építope en los antiseros de los ratones inmunizados con tres dosis de epítoto conjugado a albúmina recombinante y epítoto mezclado con albúmina recombinante (figuras 28 y 29, respectivamente). Sin embargo, en el antisero de los ratones que previamente fueron inmunizados con tres dosis de albúmina transplantada la magnitud de anticuerpos anti-építope luego de la reinfección fue significativamente mayor por sobre la de anticuerpos anti-histidina (figura 30).



**Figura 28.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos de memoria anti-építope luego de la reinfección, con la magnitud de anticuerpos anti-histidina previamente registrada, en ratones inmunizados inicialmente con tres dosis de albúmina recombinante conjugada con el epítoto.



**Figura 29.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos de memoria anti-epítoto luego de la reinfección, con la magnitud de anticuerpos anti-histidina previamente registrada, en ratones inmunizados inicialmente con tres dosis de albúmina recombinante mezclada con el epítoto.



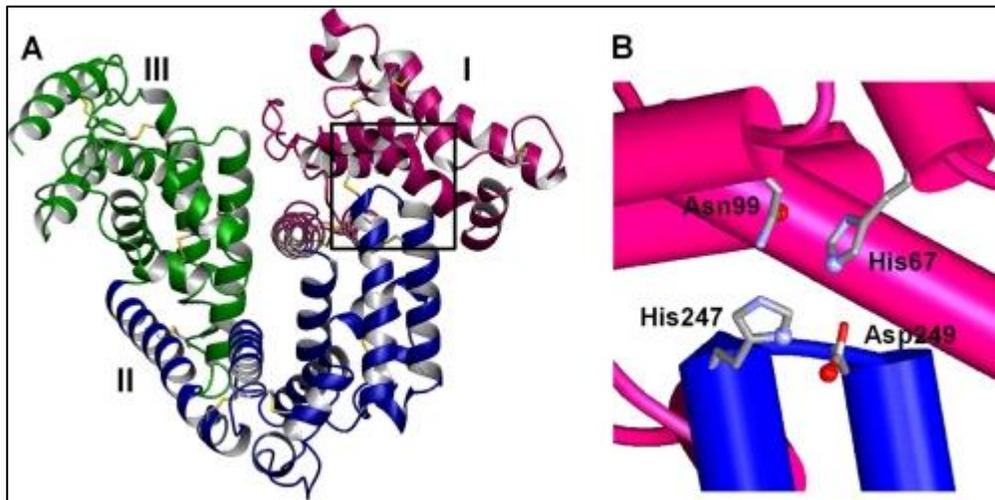
**Figura 30.** Diagrama de caja de la comparación de la magnitud de respuesta de anticuerpos de memoria anti-epítoto luego de la reinfección, con la magnitud de anticuerpos anti-histidina previamente registrada, en ratones inmunizados inicialmente con tres dosis de albúmina recombinante transplantada con el epítoto.

## VI. DISCUSIÓN

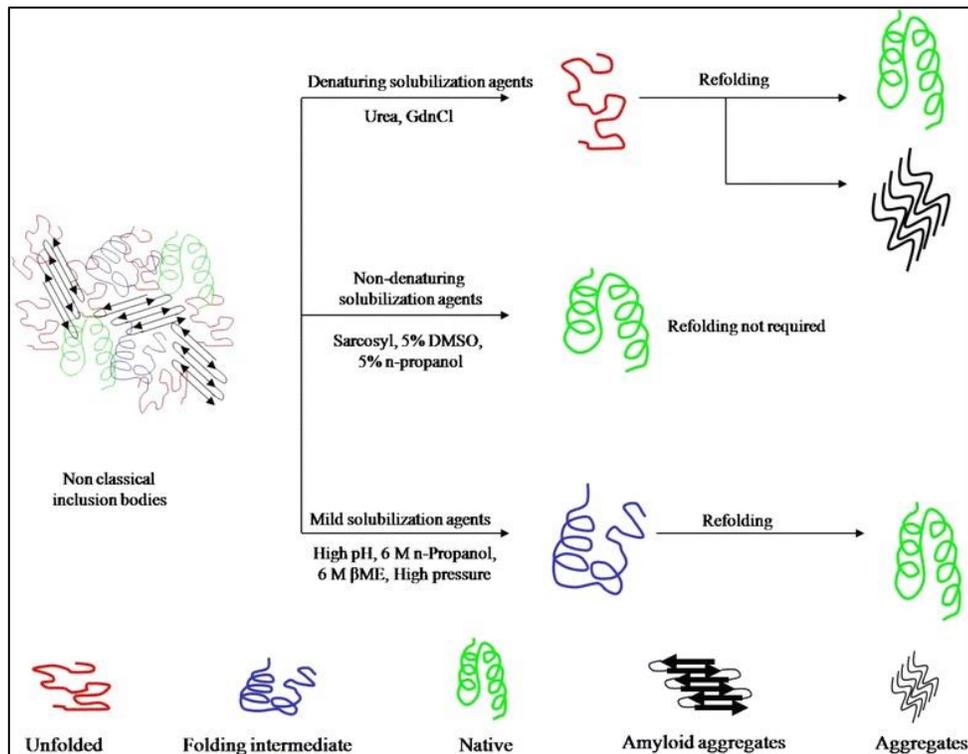
La expresión de proteínas de origen eucariota en sistemas bacterianos es una práctica experimental común en la medida que la complejidad post-traducciona de la proteína pueda ser resuelta por el sistema bacteriano de expresión. La albúmina sérica humana (Elsadek & Kratz, 2011) y la albúmina sérica de ratón (UniProtKB - P07724 (ALBU\_MOUSE)) no poseen glicosilaciones como parte de sus modificaciones post-traduccionales, y son relativamente simples a nivel estructural, formadas por hélices alfa conectadas por loops flexibles (figuras 1 y 8) por lo que el sistema de expresión bacteriano más adecuado puede producirlas en cantidades significativas. Es importante tener en cuenta que los elevados niveles de expresión de proteína recombinante en *E. coli* a menudo resultan en la agregación de moléculas de proteína expresada en cuerpos de inclusión. La formación de cuerpos de inclusión impone un gran obstáculo en la producción y purificación de proteínas recombinantes utilizando *E. coli* como hospedero (Singh et al., 2015). En este trabajo, la expresión de albúmina de ratón nativa en *E. coli* generó una proteína soluble en baja cantidad y en su mayoría se encontró ubicada en cuerpos de inclusión insolubles (figura 15). El proceso de obtención de proteína bioactiva a partir de cuerpos de inclusión es complejo y lleva a niveles de proteína recombinante a menudo bajos. Otros autores ya han obtenido proteínas eucariotas en cantidades y formas similares (Reininger et al., 2003; Padjaitan et al., 2000). Existe una diversidad de métodos que se han enfocado en el mejoramiento de la cantidad, y de la calidad de proteína recombinante, mediante la optimización de pasos individuales del proceso especialmente la solubilización de

cuerpos de inclusión y replegamiento de la proteína (figura 32). En este trabajo, se adaptó el método de solubilización de Chen et al., 1992; que permitió resolver el problema de los cuerpos de inclusión, replegando la proteína a una forma soluble que demostró además tener capacidad para transportar zinc. La capacidad de transporte de zinc fue escogida como indicador de la eficiencia de replegamiento, puesto que este ion es el que presenta mayor afinidad por la albúmina de ratón comparado a otros iones como el calcio y magnesio; iones que la albúmina sérica también puede transportar (UniProtKB - P07724 (ALBU\_MOUSE)). La albúmina sérica humana posee un sitio de unión a zinc llamado sitio A (figura 31) formado por la coordinación de 5 elementos: His 67 y Asn 99 del dominio I, His 247 y Asp 249 del dominio II (residuos conservados en todas las secuencias de albúminas de mamífero), y una molécula de agua (Blindauer, 2009). La albúmina sérica de ratón presenta un sitio de unión a zinc formado por los residuos de posición 91, 271 y 273, inferidos por similitud a la albúmina humana (UniProtKB - P07724 (ALBU\_MOUSE)). La adaptación del método propuesto por Chen et al., 1992; consistió en resuspender los cuerpos de inclusión en solución buffer 20 mM Tris-HCl, pH 8, urea 8M, y luego disminuir gradualmente la concentración de urea en cantidades de 1M en la solución buffer de resuspensión a medida la proteína era eluída en el sistema Amicon®, y utilizando una membrana capaz de retener la proteína albúmina. Finalmente, la proteína fue resuspendida en buffer 20 mM Tris-HCl, pH 8, glicerol 20% (ver anexo 4). El uso de una albúmina de ratón comercial no recombinante como control positivo permitió comparar la capacidad de transporte de zinc de esta proteína con las formas replegadas de albúmina transplantada y nativa de origen recombinante, y determinar

la eficiencia de replegamiento de estas últimas. A partir de este análisis se pudo determinar que el valor de retención de zinc debido a la proteína era muy cercano entre la albúmina comercial y la nativa recombinante, por lo que se podría decir que el plegamiento de la albúmina nativa es muy cercano al 100%. De esta misma comparación pero con la forma de albúmina transplantada se pudo determinar que la eficiencia de plegamiento de esta proteína fue del 82 %, aproximadamente (tabla 7). Adicionalmente, se incluyó un ensayo de captación de zinc para una forma de albúmina recombinante suspendida en urea, que corresponde a una solución donde la cadena polipeptídica no tendría un plegamiento nativo completo. Esta forma no plegada de la albúmina fue incluida a manera de control negativo en el análisis de captación de zinc. A partir de este ensayo se pudo observar, como era de esperarse, que la forma desnaturalizada no generara cambios en la concentración de zinc debido a que el sitio de unión a zinc podría no encontrarse correctamente plegado por lo que la proteína carecería de la capacidad para capturar iones zinc. Con los resultados obtenidos del control positivo y negativo, y comparado con lo obtenido en la albúminas transplantada y nativa recombinantes, se sugiere que ambas formas de albúminas recombinantes (nativa y transplantada) podrían encontrarse en un plegamiento muy próximo al nativo, aunque un análisis estructural fortalecería esta posible evidencia.



**Figura 31.** (A) Estructura de los dominios de la albúmina sérica humana. Dominio I (rojo), dominio II (azul), y dominio III (verde) están sostenidos entre sí por hélices e interacciones débiles. (B) El sitio interdominio de unión a zinc está formado por dos residuos del dominio I (rojo) y dos residuos del dominio II (azul). Fuente: Blindauer, et al., 2009.



**Figura 32.** Modelo mostrando diferentes métodos de solubilización utilizados para recuperar proteínas de cuerpos de inclusión. Fuente: Singh et al., 2015.

Es importante mencionar que la obtención de una forma soluble y correctamente plegada de albúmina de ratón con epítoto transplantedo garantiza que la ubicación del epítoto de Influenza se encuentre en la superficie de la proteína transportadora, y con exposición al solvente, mejorando la presentación al sistema inmune del hospedero ratón. Para lograr la expresión de la albúmina de ratón con el epítoto de Influenza transplantedo en su superficie se recurrió a una estrategia previa que podría asegurar la expresión eficiente de albúmina soluble en el sistema bacteriano. Esta estrategia consistió en la optimización del “*uso de codones*” de la secuencia original de nucleótidos del gen de albúmina con el epítoto haciendo uso del programa Optimizer (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>) (Pere, 2007). La optimización de la secuencia de nucleótidos se llevó a cabo cambiando la secuencia del gen de albúmina con epítoto transplantedo a los codones más frecuentemente utilizados por *E. coli*, lo que mejoraría el reconocimiento de la secuencia en la bacteria, y el nivel de expresión de la proteína (ver anexo 7). Si bien, al expresar la proteína transplanteda en bacteria se obtuvo en cuerpos de inclusión insolubles se logró replegar con una eficiencia del 82% comparada a la albúmina de ratón comercial y a la forma no plegada de la albúmina nativa recombinante (tabla 7).

A diferencia de los linfocitos T que reconocen péptidos digeridos, los linfocitos B pueden reconocer al antígeno en su forma nativa. La activación de linfocitos B se inicia a través de la unión entre el receptor de célula B (BCR) y el antígeno específico. El BCR puede reconocer antígenos solubles y unidos a membrana (Carrasco & Batista, 2006). El BCR está compuesto de inmunoglobulina de membrana para la unión del antígeno, y un heterodímero Ig $\alpha$ /Ig $\beta$  para la señalización

intracelular y activación de la célula B (Reth, 1992; Pleiman, 1994). Luego de la unión al antígeno y activación, el linfocito B puede convertirse en plasmoblasto extracelular que rápidamente secreta anticuerpos de baja afinidad, o entrar a un centro germinal (CG) donde el linfocito B atraviesa hipermutación somática y se desarrolla la maduración de la afinidad (figura 33). Estos linfocitos B maduros en afinidad también pueden volverse plasmoblastos que secretan anticuerpos de alta afinidad. Los linfocitos B maduros en afinidad pueden re-ingresar al centro germinal para rondas adicionales de hipermutación somática y maduración de la afinidad o volverse células de memoria (Heesters, 2016). Para maximizar la probabilidad que una célula B específica encuentre su antígeno, es importante que el antígeno esté concentrado en áreas ricas en linfocitos B en el órgano linfoide secundario (bazo y nódulos linfáticos periféricos). Los linfocitos B pueden utilizar la vía de presentación de antígeno mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) para procesar el antígeno unido al BCR e internalizar el antígeno proteico, y presentar péptidos selectos en complejo con el MHC II a linfocitos T CD4+. Este proceso se da en cuatro pasos: (1) captura del antígeno e incorporación por los linfocitos B, (2) intersección del complejo antígeno/BCR internalizado con el MHC II en compartimientos de carga del péptido, (3) generación y regulación de complejos MHC II/péptido, y (4) transporte por exocitosis para la presentación de complejos MHC II/péptido en la superficie de los linfocitos B (Adler, 2017). Para asegurar que la señal de densidad óptica detectada en el ensayo de ELISA indirecto se debiera solamente a la presencia de anticuerpos anti-epítotope en el antisuero, se enfrentó el antisuero obtenido de cada grupo de inmunización al epítotope conjugado

químicamente a una albúmina de ratón de marca comercial sin cola de histidinas (figura 34). La observación de anticuerpos anti-epítpe sugiere que el epítpe de Influenza A presente en la superficie de la proteína albúmina podría haber sido reconocido por el BCR de los linfocitos B del ratón, lo que habría estimulado la activación celular y promovido la formación de estos anticuerpos epítpe específicos (figuras 19-22).

En algunas ocasiones, la adición de cola de histidinas en las proteínas no tiene influencia en la inducción de respuesta inmune (Ling, 2008; Yap, 2009). Sin embargo, se ha observado que en proteínas candidatas a vacuna contra la malaria pudo afectar la inmunogenicidad en ratones (Khan, 2012). En el presente estudio se observó la presencia de anticuerpos anti-histidina en los antisueros de ratones que habían sido inmunizados con tres dosis de una forma de albúmina recombinante (transplantada, conjugada o mezclada) pero no en el antisuero de ratones inmunizados con tres dosis de solo el epítpe (figuras 24–27). Al comparar la magnitud de la respuesta de los anticuerpos anti-histidina con la de los anticuerpos anti-epítpe en los antisueros de ratones inmunizados con tres dosis de una forma de albúmina recombinante, se encontró un mayor nivel de anticuerpos anti-histidina solo en los antisueros de ratones inmunizados con tres dosis de albúmina recombinante conjugada y albúmina recombinante mezclada, observándose la mayor magnitud de respuesta en el antisuero de este último grupo (figuras 25 y 26). Por el contrario, no se observó diferencia significativa entre ambos tipos de anticuerpos en el antisuero de los ratones inmunizados con tres dosis de albúmina recombinante transplantada (figura 27). Además, el nivel de respuesta de los anticuerpos epítpe específicos

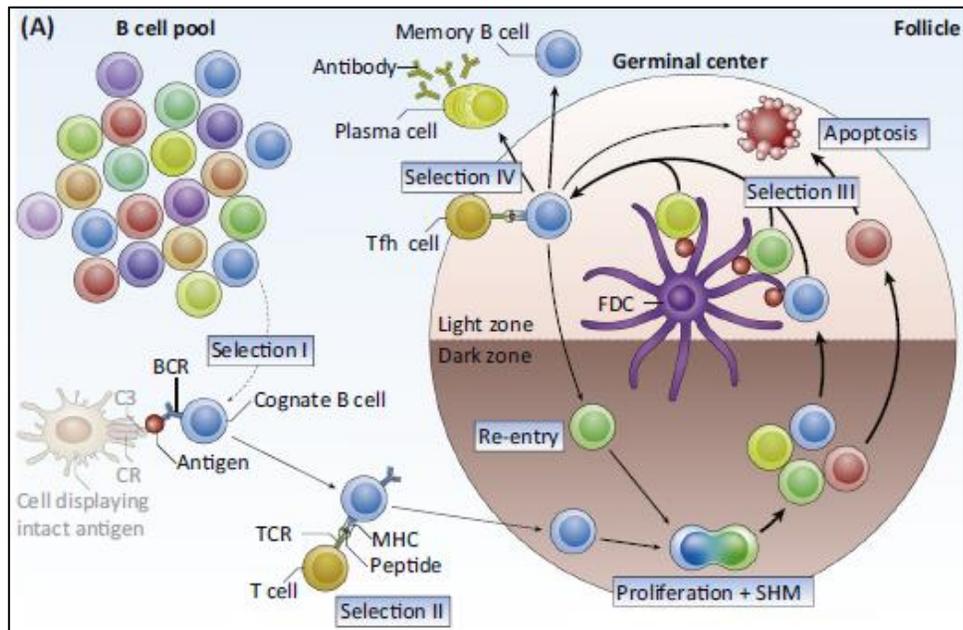
observado en el antisuero de este grupo de ratones fue el mayor comparado a los otros grupos de inmunización (figuras 19 y 20). Todo esto sugiere que podría no existir una correlación entre la magnitud de la respuesta alcanzada por los anticuerpos anti-histidina con el nivel de respuesta de los anticuerpos anti-epítotope, por lo que la inducción de la respuesta humoral frente al epítotope de influenza por la manera en la que es presentada en la albúmina podría no estarse viendo afectada. Como parte de este análisis también se comparó la magnitud de la respuesta de los anticuerpos anti-histidina con el nivel de respuesta alcanzado por los anticuerpos de memoria epítotope específicos luego de una reinfección con el epítotope, encontrándose un mayor nivel de respuesta de los anticuerpos anti-histidina comparado a la respuesta de los anticuerpos de memoria epítotope específicos en los antisueros de los ratones que habían sido inmunizados con tres dosis de albúmina recombinante conjugada y albúmina recombinante mezclada antes de la reinfección (figuras 28 y 29). Por el contrario, se observó un mayor nivel de respuesta de los anticuerpos de memoria anti-epítotope en el antisuero de los ratones que previamente habían sido inmunizados con tres dosis de albúmina recombinante transplantada antes de la reinfección (figura 30). Estos resultados fortalecen la hipótesis de que la producción de anticuerpos anti-histidina no afectaría la inmunogenicidad del epítotope presentado por la albúmina.

Como se ha mencionado anteriormente en los 03 grupos de ratones que recibieron tres dosis de una forma de epítotope con albúmina recombinante (epítotope transplantado, epítotope conjugado, y epítotope mezclado), la albúmina presenta una cola de histidinas en el extremo carboxilo terminal por lo que la diferencia en la respuesta de anticuerpos epítotope específicos vista entre estos grupos de ratones podría ser debido a

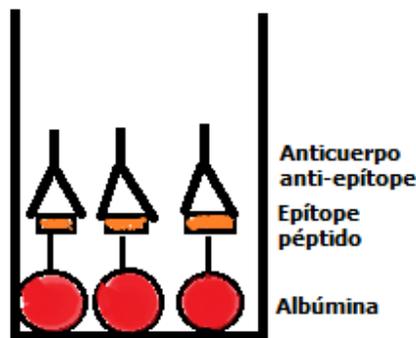
la forma en la que se presenta el epítoto asociado a la albúmina. Sin embargo, basándose en los anteriormente mencionado el uso de una albúmina sin cola de histidinas como un vehiculo de transporte para epítotos inmunogénicos transplantados podría ser conveniente dada la inmunogenicidad de la región de polihistidina.

En los antisueros correspondientes a los grupos de ratones que recibieron albúmina nativa recombinante conjugada químicamente al epítoto, albúmina nativa recombinante mezclada con el epítoto, y epítoto peptídico se detectaron anticuerpos anti-epítoto. Sin embargo, el nivel de anticuerpos disminuyó tiempo después de la administración de la tercera dosis del inmunógeno respectivo (figuras 19 y 20). Esto sugiere que la inmunogenicidad de estas tres formas de presentación del epítoto cuando no forma parte integral de la estructura de la albúmina no sería tan efectiva por el corto tiempo de vida media de minutos a unas pocas horas que tiene un péptido en circulación (Roelse, 1994; Burnett, 2017; Yi, 2105). La presentación del epítoto transplantado en la proteína sérica albúmina es capaz de estimular la producción de anticuerpos anti-epítoto hasta por lo menos 43 días luego de tres dosis (figuras 19 y 20). Esta observación podría deberse a dos factores importantes: (1) la lenta tasa de filtración de la albúmina que podría estar alargando el tiempo de vida media del péptido en circulación (Tan, 2021; Hijazi, 2021), y (2) la presentación del epítoto en la proteína albúmina conservando su localización y estructura secundaria de manera similar a cuando se encuentra en la hemaglutinina viral ayudando al reconocimiento de los linfocitos B. Ambos factores podrían actuar en conjunto aumentando el tiempo de vida media del epítoto en circulación (Tan, 2021), y beneficiando la presentación

del epítipo al sistema inmune mediante una micro inmunización continua que estimularía el incremento de la producción de anticuerpos en el tiempo.



**Figura 33.** Modelo esquemático simplificado de la maduración de la afinidad de los linfocitos B en el CG. (A) De una gran cantidad de células B algunos BCR tendrán suficiente afinidad por el antígeno para estimular la internalización y digestión del antígeno (selección I). Las células seleccionadas ingresan a la “zona oscura” del CG y pasan por hipermutación somática, variando su especificidad de BCR. Luego, después de uno o más posibles ciclos, las células B migran a la “zona clara”. Aquí, los linfocitos B que tienen BCR de alta o baja afinidad, son expuestos complejos con el antígeno que son incorporados en compartimientos endocíticos en las células foliculares dendríticas. Si la afinidad del BCR es baja o no existente, la célula B no recibe señales de supervivencia y entra en apoptosis. Modificado de: <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.003>.



**Figura 34.** Esquema de la interacción anticuerpos anti-epítoto presentes en el suero de los ratones de un grupo de inmunización con el epítoto peptídico conjugado químicamente a albúmina comercial fijado en el pocillo de la placa de ELISA.

La importancia de la retención de un antígeno por tiempo prolongado por parte de las células dendríticas foliculares ha sido un tópico de mucha controversia por muchos años. Una explicación a su relevancia podría ser al mantenimiento de la memoria mediada por células B (Heesters, 2016). Un estudio realizado por McHeyzer-Williams y colegas (2015) mostró que las células B de memoria pueden re-ingresar al CG y pasar por mayor diversificación al ser enfrentados al antígeno original. Este estudio soporta la idea de que la retención del antígeno podría influenciar en el mantenimiento de la memoria a largo plazo. Se ha observado que la producción de células de memoria en ratones puede darse a partir de una semana después de la primera administración de un antígeno, y se incrementa gradualmente hasta por lo menos 6 semanas (Hamaoka, 1969). En el presente estudio la formación de linfocitos B de memoria podría estar siendo evidenciada a partir de la detección de anticuerpos anti-epítoto luego de la administración de una dosis única de epítoto conjugado a albúmina comercial semanas después de la primera exposición al epítoto, simulando una reinfección en cuatro grupos de ratones (figura 22). Aquí se seleccionó al epítoto conjugado a albúmina comercial como antígeno debido a que se buscó estimular al sistema inmune de los ratones para que generen anticuerpos contra el epítoto luego de simular la reinfección. Dentro de los cuatro grupos de ratones evaluados se incluyó a un grupo que había recibido previamente albúmina de ratón de marca comercial como antígeno a manera de control para registrar la posible inducción de anticuerpos

anti-albúmina comercial, de la misma manera como ocurrió con los anticuerpos anti-histidina. Sin embargo, en este grupo no se registró diferencia significativa entre el suero pre-inmune y el post-inmune obtenido a los 25 días del ensayo, lo que sugiere que la respuesta inmune de memoria observada se explicaría solo por anticuerpos anti-epítotope (figura 23). En los grupos de ratones que recibieron epítotope transplantado a albúmina recombinante, epítotope conjugado químicamente a albúmina nativa recombinante, y epítotope mezclado con albúmina nativa recombinante se registró la presencia de anticuerpos anti-epítotope de memoria a los tres días de inoculada la dosis única de epítotope. Sin embargo, en los dos últimos grupos (epítotope conjugado y epítotope mezclado) se observó un descenso en el nivel de anticuerpos a los 25 días lo que sugiere que el corto tiempo de vida media en circulación del epítotope podría haber afectado el tiempo de presentación y retención del epítotope en el sistema inmune. Por el contrario, en el grupo que recibió epítotope transplantado a albúmina se registró un incremento significativo de los anticuerpos anti-epítotope de memoria a los 25 días lo que sugiere no solo la posible presencia de linfocitos B de memoria, sino también, una respuesta que se prolongaría en el tiempo (figura 22). Esta respuesta de memoria estimulada por el epítotope transplantado a albúmina podría deberse al mayor tiempo de presentación del antígeno en la circulación debido a la lenta tasa de filtración de la albúmina y a la retención del antígeno por tiempo prolongado en las células dendríticas foliculares. Por lo tanto, el epítotope inmunogénico de Influenza A transplantado en la superficie de albúmina de ratón podría estar estimulando la generación de células B de memoria y la producción de anticuerpos que se incrementan hasta por lo menos 25 días luego de la reinfección.

La mayoría de vacunas que se encuentran disponibles actualmente se basan en tecnologías de inactivación o atenuación. Sin embargo, ambas tecnologías tienen limitaciones y problemas potenciales asociados. Las vacunas inactivadas deben ser totalmente inocuas y no infectivas. Las vacunas atenuadas deben ser precisamente controladas y caracterizadas de modo que provean del nivel requerido de inmunidad protectora sin causar síntomas de la enfermedad de manera significativa en el hospedero (Francis, 2017). Las vacunas peptídicas corresponden a cadenas cortas de aminoácidos que son sitios inmunogénicos importantes en agentes infecciosos. La primera evidencia que este tipo de péptidos tenían potencial de vacuna fue demostrada en 1963 utilizando el virus del mosaico del tabaco donde un fragmento hexapéptido aislado químicamente del capsómero del virus fue acoplado a albúmina sérica bovina y utilizado para estimular la producción de anticuerpos en conejos que neutralizaran al virus (Anderer, 1963). Una vez que un péptido candidato es identificado o predicho, debe ser entregado al sistema inmune de tal manera que estimule no solo un alto título de anticuerpos anti péptido sino también anticuerpos que van a reconocer y neutralizar al agente infeccioso. Por tal razón, para probar la ‘prueba de concepto’ del trasplante se seleccionó un epítipo peptídico de Influenza A H3N2 que había probado ser inmunogénico (Li, 2003). Además, se aseguró que la estructura del epítipo peptídico se conservara tal cual se encuentra en la hemaglutinina viral luego de su inserción en la albúmina, para garantizar una correcta presentación y reconocimiento por el sistema inmune del hospedero. Otra forma de presentación de vacunas peptídicas está enfocada en la presentación de múltiples copias de péptidos fusionadas a los genes codificantes de grandes proteínas, de modo

que generen constructos nuevos. El uso de secuencias de péptidos fusionadas a proteínas bacterianas como inmunógenos tiene la ventaja potencial de una estructura definida y uniforme comparada a la naturaleza no caracterizada y variable de un conjugado péptido/transportador preparado químicamente (Francis, 2017). En este sentido, la mayor producción de anticuerpos anti-epítoto estimulada por el inmunógeno formado por el epítoto transplantado en la proteína albúmina comparado al mismo epítoto conjugado químicamente a la albúmina podría deberse a la conservación de la estructura tridimensional global del epítoto y la albúmina, que favorecería a su vez a la adecuada presentación del epítoto al sistema inmune. Así mismo, la conservación de la estructura tridimensional de la albúmina transplantada podría estar ayudando a mantener algunas de las propiedades intrínsecas de la proteína albúmina: la capacidad de transporte de zinc y el lento perfil de filtración en circulación. Justamente, esta última propiedad de la albúmina podría haber favorecido un mayor tiempo de retención del epítoto en las células del sistema inmune y generado memoria inmunológica.

## VII. CONCLUSIONES

- Fue posible recuperar una albúmina nativa recombinante y una albúmina con un epítoto de Influenza transplantado en su superficie, de cuerpos de inclusión insolubles, y replegarlas con aproximadamente un 100% y 82% de eficiencia de plegamiento, respectivamente.
- Un epítoto peptídico que ha demostrado ser inmunogénico y es transplantado en la superficie de una proteína transportadora como la albúmina sérica de ratón es capaz de estimular a través del tiempo la producción de anticuerpos anti-epítoto en ratones, de manera significativamente mayor que el mismo epítoto conjugado químicamente a la albúmina, mezclado con la albúmina o solo.
- El transplante de un epítoto inmunogénico a una proteína de tasa de filtración lenta en el organismo, como la albúmina, podría estar permitiendo una mayor persistencia del epítoto en circulación y un mayor tiempo de presentación al sistema inmune generando células B de memoria productoras de anticuerpos anti-epítoto.

## VIII. RECOMENDACIONES

Vistos los resultados sobre la “prueba de concepto” del trasplante de un epítoto inmunogénico sobre la superficie de una proteína sérica transportadora de lenta taza de filtración, se sugiere desarrollar una proteína transportadora con un número mayor de repeticiones del mismo epítoto aprovechando que la estructura de la albúmina es una proteína que presenta una serie de loops flexibles que pueden servir como lugares de trasplante. La respuesta humoral que podría ser generada por la estimulación con este tipo de proteína multiepitópica transplantada posiblemente sería significativamente mayor a la hallada en este trabajo de investigación. Es importante mencionar que el desarrollo de esta proteína podría venir de la mano de un método de purificación alternativo al uso de cola de histidinas con la finalidad de evitar la respuesta inmunogénica contra la región de polihistidina.

Alternativamente, se podría desarrollar una proteína albúmina que contenga varias repeticiones de diferentes epítotos inmunogénicos de Influenza A, como los reportados por Li (2003), realizando el trasplante de los epítotos en las regiones más similares a nivel de secuencia y estructura en la albúmina. De esta manera se lograría una proteína multiepitópica transplantada que podría presentar una respuesta humoral mejorada.

Se recomienda extender el análisis de la respuesta humoral estimulada por la proteína transplantada incluyendo un estudio del nivel de protección del antisuero de los ratones, a través de la medición de la actividad neutralizante contra el virus de

Influenza A por ensayo de inhibición de hemaglutinación e inhibición de la formación de placa del virus. Así mismo, complementar los hallazgos de eficiencia de replegamiento con un estudio del análisis estructural de la albúmina (dicroísmo circular, cristalización) para conocer la real dimensión del plegamiento logrado en la proteína.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adler LN, Jiang W, Bhamidipati K, Millican M, Macaubas C, Hung S-c and Mellins ED (2017) The Other Function: Class II-Restricted Antigen Presentation by B Cells. *Front. Immunol.* 8:319. doi: 10.3389/fimmu.2017.00319
2. Anderer, F. A. (1963) Versuch zur bestmuning der seralogisch termmaten gruppen des tobakmosaik vuus. *Naturforsch Tell B.* 188, 1010–1014.
3. Bingfa X., Qinglin F., Hui H., Canjun W., Wei W., Lihua S. 2009. Anti-Hepatitis B virus activity and mechanisms of recombinant human serum albumin-interferon- $\alpha$ -2b fusion protein in vitro and in vivo. *Pharmacology*; 83:323-332.
4. Blindauer, C. A., Harvey, I., Bunyan, K. E., Stewart, A. J., Sleep, D., Harrison, D. J., Berezenko, S., & Sadler, P. J. (2009). Structure, properties, and engineering of the major zinc binding site on human albumin. *The Journal of biological chemistry*, 284(34), 23116–23124. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003459>
5. Burnett LC, Skowronski AA, Rausch R, LeDuc CA, Leibel RL. Determination of the half-life of circulating leptin in the mouse. *Int J Obes (Lond)*. 2017 Mar;41(3):355-359. doi: 10.1038/ijo.2016.238. Epub 2016 Dec 27. PMID: 28025576; PMCID: PMC5340585.
6. Bystroff C, Thorsson V & Baker D. (2000). HMMSTR: A hidden markov model for local sequence-structure correlations in proteins. *Journal of Molecular Biology* 301, 173-90.
7. Carrasco, Y.R. and Batista,F.D.(2006)B cell recognition of membrane-bound antigen: an exquisite way of sensing ligands. *Curr. Opin.Immunol.* 18, 286–291.

8. Chen YH, Xiao Y, Yu TW and MP Dierich. 1999. Epitope-vaccine: A new strategy against HIV-1. *Immunol. Today* 20: 588-589
9. Chen Z., Wu I., Richter W. L., Gegenheimer P. 1992. Over-expression and refolding of  $\beta$ -subunit from the chloroplast ATP synthase. *Federation of European Biochemical Societies*; 298:69-73.
10. Clissold P, Bishop J.O. (1981). Molecular Cloning of cDNA sequences transcribed from mouse liver endoplasmic reticulum poly(A) mRNA. *Gene* 15, 225-235.
11. Combet C, Jambon M, Deléage G & Geourjon C. Geno3D: Automatic comparative molecular modelling of protein. *Bioinformatics*, 2002, 18, 213-214
12. Corrigan EM and Clancy RL. 1999. Is there a role for a mucosal influenza vaccine in the elderly? *Drugs Aging* 15: 169-181
13. Couch RB, Keitel WA and Cate TR. 1997. Improvement of inactivated influenza virus vaccines. *J. Infect. Dis.* 176 (Suppl. 1): 538-544
14. Cox NJ and Subbarao K. 1999. Influenza. *Lancet* 354: 1277-1282
15. Elsadek B., Kratz F. Impact of albumin on drug delivery – New applications on the horizon. *Journal of Controlled Release* (2011), doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.069
16. Fischer, D., Barret, C., Bryson, K., Elofsson, A., Godzik, A., Jones, D., Karplus, K.J., Kelley, L.A., Maccallum, R.M., Pawowski, K., Rost, B., Rychlewski, L. and Sternberg, M.J. CAFASP-1: Critical Assessment of Fully Automated Structure Prediction Methods Proteins: Structure, Function and Genetics, Suppl 3:209-217 (1999)

17. Flisiak R and Flisiak I. 2010. Albinterferon-alfa 2b: a new treatment option for hepatitis C. *Expert Opin. Biol. Ther.* 10: 1509-1515.
18. Francis MJ. Peptide vaccines for viral diseases. *Sci Prog* 1990;74:115–30.
19. Furukawa M., Tanaka R., Giam Chuang V., Ishima Y. 2011. Human serum albumin-thioredoxin fusion protein with long blood retention property is effective in suppressing lung injury. *Journal of Controlled Release.* 154: 189-195
20. Galliano M., Watkins S., Madison J., Putnam F.W., Kragh-Hansen U., Cesati R., Minchiotti L. 1998. Structural characterization of three genetic variants of human serum albumin modified in subdomains IIB and IIIA. *Eur. J. Biochem*; 251:329-334.
21. Geourjon C, Combet C, Blanchet C, Deleage G. Identification of related proteins with weak sequence identity using secondary structure information. *Protein Sci* 2001 Apr;10(4):788-97
22. Guo X., Huang L. 2011. Recent advances in nonviral vectors for gene delivery. *Accounts of Chemical Research.*
23. Hamaoka, T., Kitagawa, M., Matsuoka, Y., & Yamamura, Y. (1969). Antibody production in mice. I. The analysis of immunological memory. *Immunology*, 17(1), 55–69.
24. Heckman K and Pease L. Gene Splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nature Protocols.* 2007. Vol 2. N.4.
25. Heesters B. A., van de Poel C. E., Das A., Carroll M. C (2016) Antigen presentation to B cells. *Trends in Immunology.* 37, 844-854.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.003>.

26. Hijazi Y. Prediction of Half-Life Extension of Peptides via Serum Albumin Binding: Current Challenges. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2021 Mar;46(2):163-172. doi: 10.1007/s13318-020-00664-y. Epub 2021 Jan 1. PMID: 33386550.
27. Hogue Ruth Angeletti. Laboratory for Macromolecular Analysis, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461. *J Biomol Tech* 1999;10:2-10.
28. Hung LH., Ngan SC., Liu T., and Samudrala R. PROTINFO: new algorithms for enhanced protein structure predictions. *Nucleic Acid R.* 2005 Jul 1; 33(2): W77-80.
29. Hung LH., Samudrala R. PROTINFO: Secondary and tertiary protein structure prediction. *Nucleic Acid Res.* 2003 Jul 1; 31(13): 3296-9.
30. Kelley L.A., R. Maccallum and M.J.E. Sternberg Recognition of Remote Protein Homologies Using Three-Dimensional Information to Generate a Position Specific Scoring Matrix in the program 3D-PSSM RECOMB 99, Proceedings of the Third Annual Conference on Computational Molecular Biology. N. Editors: Sorin Istrail, Pavel Pevzner, Michael Waterman. The Association for Computing Machinery. New York. 1999. Pages 218-25.
31. Kelley LA, MacCallum RM & Sternberg MJE (2000). Enhanced Genome Annotation using Structural Profiles in the Program 3D-PSSM. *J. Mol. Biol.* 299(2), 499-520.
32. Khan F, Legler PM, Mease RM, Duncan EH, Bergmann-Leitner ES, Angov E. Histidine affinity tags affect MSP1(42) structural stability and immunodominance

- in mice. *Biotechnol J.* 2012 Jan;7(1):133-47. doi: 10.1002/biot.201100331. Epub 2011 Dec 28. PMID: 22076863.
33. Kobayashi N., Nishikawa M., Takakura Y. 2005. The hydrodynamics-based procedure for controlling the pharmacokinetics of gene medicines at whole body, organ and cellular levels. *Advanced Drug Delivery Reviews.*; 57:713-731.
34. Kratz F. 2008. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *Journal of Controlled Release.* 132: 171-183.
35. Kratz F., Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *Journal of Controlled Release* (2011), doi: 10.1016/j.jconrel, 2011.11.028
36. Krivov GG., Shapovalov MV., and Dunbrack RL Jr. Improved prediction of protein side-chain conformations with SCWRL4. *Proteins* 2009 Dec; 77(4): 778-95.
37. Levitt M., Hirshberg M., Sharon R., and Daggett V. Potential energy function and parameters for simulations of the molecular dynamics of proteins and nucleic acids in solution. *Computer Physics C.* 1995 Sep 2; 91(1-3): 215-231.
38. Li H, Ding J, Chen Y. 2003. Recombinant protein comprising multi-neutralizing epitopes induced high titer of antibodies against Influenza A virus. *Immunobiol.* 207: 305-313.
39. Ling, Z., Tran, K.C., Arnold, J. J., Teng, M.N., Purification and characterization of recombinant human respiratory syncytial virus nonstructural protein NS1. *Protein Expr. Purif.* 2008, 57, 261–270.

40. Marques J.A., George J.K., Smith I.J., Bhakta V., Sheffield W.P. 2001. A Barbourin-albumin fusion protein that is slowly cleared in vivo retains the ability to inhibit platelet aggregation in vitro. *Thromb Haemost*; 86:902-908.
41. Martin JT. 1997. Development of an adjuvant to enhance the immune response to influenza vaccine in the elderly. *Biologicals* 25: 209-213
42. McHeyzer-Williams, L.J. et al. (2015) Class-switched memoryB cells remodel BCRs within secondary germinal centers. *Nat. Immunol.* 16, 296–305.
43. Melder RJ, Grzegorzewski K, Osborn B, et al. Induction of Anti-B16 Melanoma Responses in Mice by Albuleukin™, An Interleukin-2 (IL-2)/Human Serum Albumin Fusion Protein. *Society for Biological Therapy Meeting* (Poster #28). Nov. 2002.
44. Metzner H. J., Weimer T., Kronthaler U., Lang W., Schulte S. 2009. Genetic fusion to albumin improves the pharmacokinetic properties of factor IX. *Thromb Haemost*; 102:634-644.
45. Michael James Francis, Recent Advances in Vaccine Technologies, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, Volume 48, Issue 2, 2018, Pages 231-241, ISSN 0195-5616, ISBN 9780323581806, <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.10.002>.
46. Miyakawa N., Nishikawa M., Takahashi Y., Ando M., Misaka M., Watanabe Y., Takahura Y. 2011. Prolonged circulation half-life of Interferon  $\gamma$  activity by gene delivery of interferon  $\gamma$ -serum albumin fusion protein in mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 100:2350-2357.

47. Müller D., Karle A., Meißburger B., Höfig I., Stork R., Kontermann R.E. 2007. Improved Pharmacokinetics of recombinant bispecific antibody molecules by fusion to human serum albumin. *The Journal of Biological Chemistry*. Vol. 282:12650-12660.
48. Müller N., Schneider B., Pfizenmaier K., Wajant H. 2010. Superior serum half life of albumin tagged TNF ligands. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 396:793-799.
49. Nelson D.R., Benhamou Y., Chuang Wan-Long, Lawitz E.J., Rodriguez-Torres M. 2010. Albinterferon alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- $\alpha$  in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus genotype 2 or 3. *Gastroenterology*; 139(4): 1267-1276.
50. Notredame C., Higgins D., Heringa J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol*. 2000 Sep 8;302(1):205-17.
51. Osborn B., Sekut L., Corcoran M., Poortman C. 2002. Albutropin: a growth hormone-albumin fusion with improved pharmacokinetics and pharmacodynamics in rats and monkeys. *European Journal of Pharmacology*. 456: 149-158.
52. Pandjaitan B, Swoboda I, Brandejsky-Pichler F, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer .(2000). Escherichia coli expression and purification of recombinant dog albumin, a cross-reactive animal allergen. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 105 (2 Pt1):279–85. Citado en PubMed; PMID: 10669848.
- Disponible en:
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.ezproxy.welch.jhmi.edu/pubmed/?term=10669848>

53. Pearson WR. (1998) Empirical statistical estimates for sequence similarity searches. In *J. Mol. Biol.* 276:71-84
54. Pearson, WR. (1996) Effective protein sequence comparison. In *Meth. Enz.*, R. F. Doolittle, ed. (San Diego: Academic Press) 266:227-258
55. Pearson, WR. (1999) Flexible sequence similarity searching with the FASTA3 program package. *Methods in Molecular Biology*
56. Pere Puigbò, Eduard Guzmán, Antoni Romeu, Santiago Garcia-Vallvé, OPTIMIZER: a web server for optimizing the codon usage of DNA sequences, *Nucleic Acids Research*, Volume 35, Issue suppl\_2, 1 July 2007, Pages W126–W131, <https://doi.org/10.1093/nar/gkm219>
57. Pleiman, C. M., D'Ambrosio, D., Cambier, J. C. (1994). The B-cell antigen receptor complex: structure and signal transduction. *Trends in Immunology*. 15 (9), 393-399.
58. Pockros Paul J. 2010. Why do we need another interferon?. *Gastroenterology*; 139:1084-1086.
59. Reininger R, Swoboda I, Bohle B, Hauswirth AW, Valent P, Rumpold H, Valenta R, Spitzauer S. (2003). Characterization of recombinant cat albumin. *Clin Exp Allergy*.33(12):1695-702.
60. Reth M. Antigen receptors on B lymphocytes. *Annu Rev Immunol* (1992) 10:97–121. doi:10.1146/annurev.iy.10.040192.000525
61. Roelse, J., Grommé, M., Momburg, F., Hämmerling, G., & Neefjes, J. (1994). Trimming of TAP-translocated peptides in the endoplasmic reticulum and in the

- cytosol during recycling. *The Journal of experimental medicine*, 180(5), 1591–1597. <https://doi.org/10.1084/jem.180.5.1591>.
62. Rustgi V. 2009. Albinterferon alfa-2b, a novel fusion protein of human albumin and human interferon alfa-2b, for chronic hepatitis C. *Current Medical Research and Opinion*. Vol. 25, 4:991-1002.
63. Schulte S. 2008. Use of albumin fusion technology to prolong the half-life of recombinant factor VIIa. *Thrombosis Research*; 122 Suppl. 4, S14-S19.
64. Schulte S. 2009. Half-life extension through albumin fusion technologies. *Thrombosis Research*. 124 Suppl. 2: S6-S8.
65. Sciutto E, Gomez-Conde E, Villalobos N, de Aluja A, Gonzalez E, Acero G, Fragoso G, Gevorkian G, Diaz-Orea A, Manoutcharian K. 2004. Recombinant bacteriophage-based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 99: 11-24.
66. Shandar Ahmad, Michael GRomiha, Hamed Fawareh and Akinory Sarai. ASAView: Database and tool for solvent accessibility representation in proteins. *BMC Bioinformatics* 2004, **5**:51
67. Sheffield W.P., Marques J.A., Bhakta V. Smith I.J. 2000. Modulation of Clearance of recombinant Serum albumin by either glycosylation or truncation. *Thrombosis Research*. 99:613-621.
68. Simeckova-Rosenberg J, Jun Z, Wyde PR and Atassi MZ. 1995. Protection of mice against lethal viral infection by synthetic peptides corresponding to B- and T-cell recognition sites of influenza A hemagglutinin. *Vaccine* 13: 927-932

69. Singh A, Upadhyay V, Upadhyay AK, Singh SM, Panda AK. Protein recovery from inclusion bodies of Escherichia coli using mild solubilization process. *Microb Cell Fact.* 2015 Mar 25;14:41. doi: 10.1186/s12934-015-0222-8.
70. Singh,H. and Raghava,G.P.S.(2001) ProPred: Prediction of HLA-DR binding sites. *Bioinformatics*,17(12), 1236-37.
71. Skehel JJ and Wiley DC. 2002. Influenza haemagglutinin. *Vaccine* 20 (Suppl.): 551-54
72. Subramanian G.M., Moore P.A., Gowen B.B., Olsen A.L., Barnard D.L., Paragas J. 2008. Potent in vitro activity of the albumin-fusion type 1 interferons (albumin-interferon-alpha and albumin-interferon-beta) against RNA viral agents of bioterrorism and the severe acute respiratory syndrome (SARS) Virus. *Chemotherapy.* 54:176-180.
73. Sung C., Nardelli B., Lafleur D. W., Blatter E., Corcoran M. 2003. An IFN- $\beta$ -Albumin fusion protein that displays improved pharmacokinetic and pharmacodynamics properties in nonhuman primates. *Journal of interferon and cytokine research.*23:25-36.
74. Tan H, Su W, Zhang W, Zhang J, Sattler M, Zou P. Albumin-binding domain extends half-life of glucagon-like peptide-1. *Eur J Pharmacol.* 2021 Jan 5;890:173650. doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173650. Epub 2020 Oct 10. PMID: 33049303.
75. Tian HJ, Xiao Y, Zhu M, Dierich MP and Chen YH. 2001. Induction of monoclonal antibodies with predefined epitope-specificity by epitop-vaccines. *Immunol. Lett.* 75: 161-162

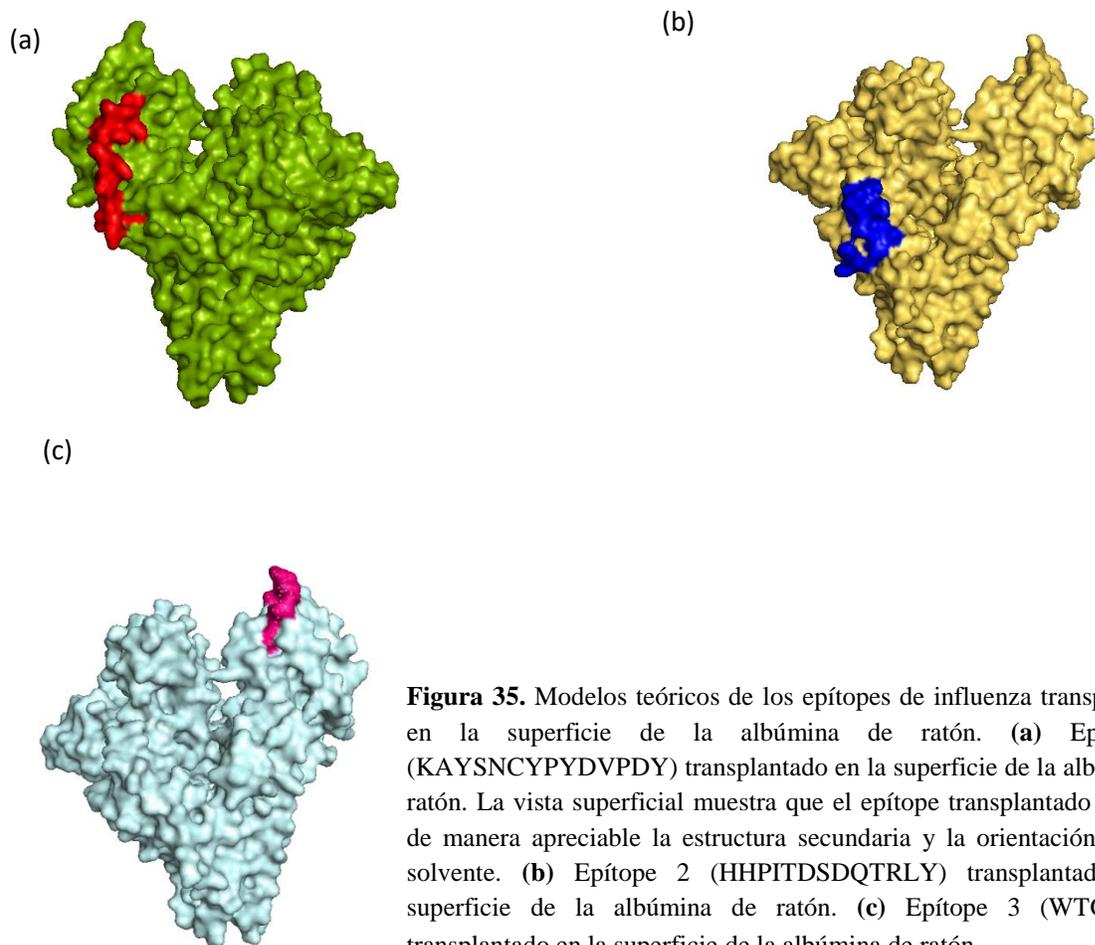
76. Viúdez A, Ramírez N, Hernández-García I, Carvalho FL, Vera R, Hidalgo M. Nab-paclitaxel: a flattering facelift. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2014 Dec;92(3):166-80. doi: 10.1016/j.critrevonc.2014.06.001. Epub 2014 Jun 28. PMID: 25048167.
77. Wilson IA and Cox NJ. 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annu. Rev. Immunol.* 8:737-771.
78. Xiao Y, Lu Y and Chen YH. 2001. Epitope-vaccine as a new strategy against HIV-1 mutation. *Immunol. Lett.* 77(1):3-6
79. Xie D., Yao C., Wang L., Min W., Xu J., Xiao J., Huan M., Chen B., Liu B., Li X., Jiang H. 2010. An Albumin-conjugated peptide exhibits potent anti-HIV activity and long in vivo half-life. *Antimicrob. Agents Chemother*; 54(1):191-196
80. Yap, W. B., Tey, B.T., Ng, M.Y., Ong, S.T., Tan, W. S., N-terminally His-tagged hepatitis B core antigens: Construction, expression, purification and antigenicity. *J. Virol. Methods* 2009, 160, 125–131.
81. Yi J, Warunek D, Craft D. Degradation and Stabilization of Peptide Hormones in Human Blood Specimens. *PLoS One*. 2015 Jul 29;10(7):e0134427. doi: 10.1371/journal.pone.0134427. PMID: 26222180; PMCID: PMC4519045.
82. Zeuzem S, Sulkowski M, Lawitz E, Rutski V. 2010. Albinterferon Alfa-2b was not inferior to pegylated interferon- $\alpha$  in a randomized trial of patients with chronic hepatitis C virus Genotype 1. *Gastroenterology*. 139: 1257-1266.
83. Zhan J., Chen Y., Yuan Han-Ying, Li H., Lu H. 2011. Fusion of HAS influences TNF- $\alpha$  neutralizing activity of shTNFRs. *Biotechnol Lett*. DOI 10.1007/s10529-011-0793-3.

84. Zhao H. L., Qin Yao X., Xue C., Wang Y., Hua Xiong X., Min Liu Z. 2008. Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon- $\alpha$ 2b fusion protein by linker engineering. *Protein Expression and Purification*. 61:73-77.
85. Zhao H.L., Xue C., Wang Y., Sun B., Qin Yao X., Min Liu Z. 2009. Elimination of the free sulfhydryl group in the human serum albumin (HAS) moiety if human interferon- $\alpha$ 2b and HAS fusion protein increases its stability against mechanical and thermal stresses. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.72:405-411

## X. ANEXOS

### ANEXO 1

#### Modelos estructurales de los epítopes inmunogénicos transplantados en la superficie de la proteína albúmina de ratón



**Figura 35.** Modelos teóricos de los epítopes de influenza transplantados en la superficie de la albúmina de ratón. **(a)** Epítotope 1 (KAYSNCYPYDVPDY) transplantado en la superficie de la albúmina de ratón. La vista superficial muestra que el epítotope transplantado conserva de manera apreciable la estructura secundaria y la orientación hacia el solvente. **(b)** Epítotope 2 (HHPITDSDQTRLY) transplantado en la superficie de la albúmina de ratón. **(c)** Epítotope 3 (WTGVAQD) transplantado en la superficie de la albúmina de ratón.

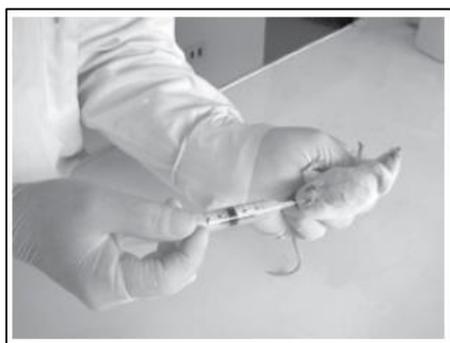
## ANEXO 2

### Protocolo de extracción del ARNm de albúmina del hígado de ratón

#### 1. Recolección de las muestras del hígado de los ratones hembra Balb/c

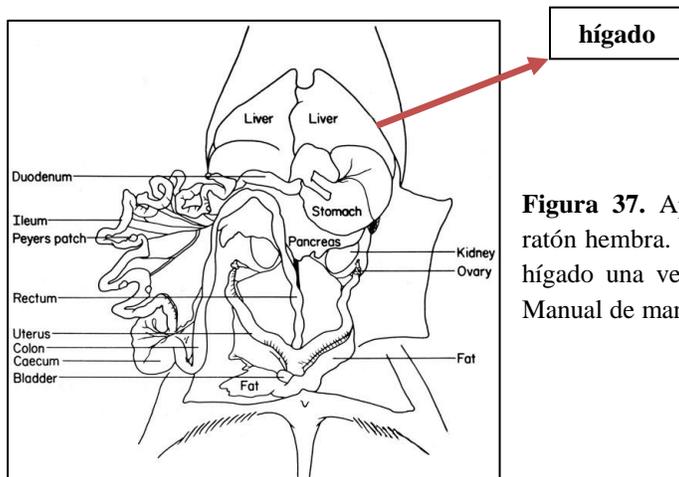
Los ratones adquiridos en el bioterio de la Universidad Peruana Cayetano Heredia fueron 02 hembras *Mus musculus* cepa Balb/c de 03 meses cada uno debido a que presentan una abundante cantidad de mensajero de albúmina en comparación al total de mensajeros presentes en el hígado (Clissold et al. 1981). Se recolectaron 05 muestras de hígado de cada uno de los ratones haciendo un total de 10 muestras de tejido hepático de ratón. A continuación se muestra el protocolo que se usó en la recolección de hígado de ratón y su posterior almacenamiento en la solución de conservación RNAlater.

- A. Cada uno de los ratones fue inyectado por vía intraperitoneal (figura 36) con los anestésicos: xilacina (20mg/kg) y ketamina (5mg/kg). Posteriormente por inyección directa al corazón se administró el agente eutanásico halatal (20mg/kg).



**Figura 36.** Ilustración del modo de administración intraperitoneal de los anestésicos. Fuente: Manual de manejo de ratones del INS, 2008

- B. Una vez confirmada la muerte de los 2 ratones, mediante el análisis de los reflejos en los animales; se procedió a abrir la cavidad abdominal y a separar el hígado del canal alimenticio y del resto de órganos (Figura 37).



**Figura 37.** Apertura de la cavidad abdominal de un ratón hembra. Puede observarse la ubicación exacta del hígado una vez abierta la cavidad abdominal. Fuente: Manual de manejo de ratones del INS, 2008.

- C. El hígado fue cortado en pedazos de 0.5cm con un peso aproximado de 0.1g de acuerdo a lo mencionado en el protocolo *RNAlater* Invitrogen. Se depositaron 03 pedazos de muestra de hígado en viales con 1ml de *RNA later* obteniéndose 05 viales con muestras de hígado de cada uno de los ratones.
- D. Los 10 viales de *RNAlater* conteniendo las muestras de hígado fueron incubados a 4°C entre 18 a 24 horas, a fin de que la acción protectora y estabilizadora del *RNAlater* sobre el RNA celular penetre completamente el tejido.
- E. Al día siguiente 02 viales de cada ratón fueron tratados con TRIzol (Ambion) para la extracción de RNA. El resto de viales fueron almacenados a -70°C para su posterior uso.

## 2. Aislamiento del ARN del hígado de ratón

Los siguientes materiales descritos en la tabla 8 fueron necesarios para la extracción de ARN proveniente de hígado de ratón.

Extracción de RNA
TRIzol
Cloroformo
Isopropanol (2-propanol)
Etanol 75% (en H <sub>2</sub> O-DEPC)
H <sub>2</sub> O “RNAsa-free”
Microcentrifuga de tubos eppendorf por sobre las 12,000 x g
Homogenizador
Ommitip Plastic Generator Probe
Tubos eppendorf “RNAsa-free” x 2ml de fondo cónico (de ser posible de tapa rosca)
02 Racks limpios para depositar eppendorf (1 para trabajo en cabina y 1 para transporte)
Incubadora de Baño seco (60°C)
04 pares de guantes sin talco
Tips 1000µL, 200µL, 10µL con filtro
Cronometro

**Tabla 8.** Lista de materiales necesarios para el ensayo de extracción de RNA a partir de tejido.

## Recomendaciones:

- El TRIzol, previamente almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , deberá estar a temperatura ambiente. Este atemperamiento no es tan crítico si se toma en cuenta que el proceso de homogenización produce un breve calentamiento de la muestra a los 30 – 45 seg.
- Deberá usarse el volumen justo de cloroformo ya que este se evapora posteriormente. Su uso es a temperatura ambiente.
- Deberá usarse el volumen justo de isopropanol ya que este se evapora posteriormente. Su uso es a temperatura ambiente.
- El etanol 75% en H<sub>2</sub>O-DEPC deberá ser preparado a partir de etanol absoluto en agua previamente tratada con DEPC.
- El agua “RNAsa-free” deberá estar a temperatura de  $60^{\circ}\text{C}$  utilizando la incubadora de baño seco hasta usarse en la resuspensión del RNA.
- El Omnitip deberá descartarse luego de su uso.
- Antes de iniciar el trabajo, la cabina deberá ser previamente limpiada con lejía 20%, etanol 70% y solución *RNase Away*, en ese orden. Posteriormente, la cabina debe ser esterilizada con UV. Asegurarse de colocar todos los materiales en el orden más adecuado.

### **3. Homogenización de las muestras**

- A. Se retiraron las muestras de tejido animal del RNA *later* usando pinzas estériles.
- B. Se depositaron 3 trozos de hígado de ratón, con un tamaño  $\leq 0.5\text{cm}$  (de preferencia grandes) y con un peso aproximado de 0.1g, en un 1ml de TRIzol (100mg de tejido en 1ml de TRIzol).
- C. Se homogenizó la muestra usando un OMNITIP por 45 segundos asegurándose de colocarlo a una altura que no genere la formación de espuma que pueda escaparse del tubo. Se verificó la correcta homogenización.

### **3. Separación de fases**

- D. Se incubaron por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación del complejo de nucleoproteínas.
- E. Se agregó 0.2ml de cloroformo por 1ml de TRIzol. Se cerró la tapa.
- F. Se mezcló fuertemente por 15 segundos.
- G. Se incubó por 3 minutos a temperatura ambiente.
- H. Se centrifugó la muestra a 12,000 x g por 15 minutos. La mezcla fue separada en una fase inferior de fenol-cloroformo de color rojo, una fase intermedia, y una fase superior incolora donde se encuentra el RNA (figura 38).
- I. Se dispensó 500 $\mu\text{L}$  de la fase acuosa evitando mezclar con las otras fases. Se colocó en tubos de 1.5 ml nuevos.



**Figura 38.** Separación de fases en la extracción de RNA de tejido usando TRIzol.

#### **4. Precipitación del ARN**

- J. Se agregó 0.5ml de isopropanol 100% a la fase acuosa por cada 1ml de TRIzol.
- K. Se homogenizó suavemente por semi-inversión.
- L. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos.
- M. Se centrifugó a 12,000 x g por 10 minutos. Se observó la formación de un precipitado a un lado del fondo del tubo.

#### **5. Lavado del ARN**

- N. Se decantó todo el sobrenadante dejando solo el precipitado de RNA.
- O. Se lavó el precipitado con 1ml de etanol 75%.
- P. Se homogenizó suavemente por semi-inversion.

- Q. Se centrifugó a 12,000 x g por 5 minutos. Se eliminó el etanol con cuidado asegurándose de eliminarlo completamente. Se recomienda usar pipeta de 200µL para terminar de eliminar el etanol.
- R. Se secó el pellet de RNA por 3 minutos con la tapa del tubo abierta. Se evitó secar completamente solo hasta asegurarse que se observe un cambio de color en el borde del pellet.

## **6. Resuspensión del ARN**

- S. Se resuspendió el RNA en 100 µL de agua libre de RNAsa, hasta lograr que el pellet se homogenice totalmente.
- T. Se preparó diluciones 1/10 de cada muestra. 5µL de muestra stock en 45µL de agua libre de RNAsa.
- U. Se midió la concentración de RNA en el nanodrop usando 1 µL de agua libre de RNAsa como blanco.
- V. Se almacenó las muestras a -70°C.

## ANEXO 3

### MAPA DEL VECTOR DE CLONACIÓN/EXPRESIÓN PET28A

#### pET-28a-c(+) Vectors

TB074 12/98

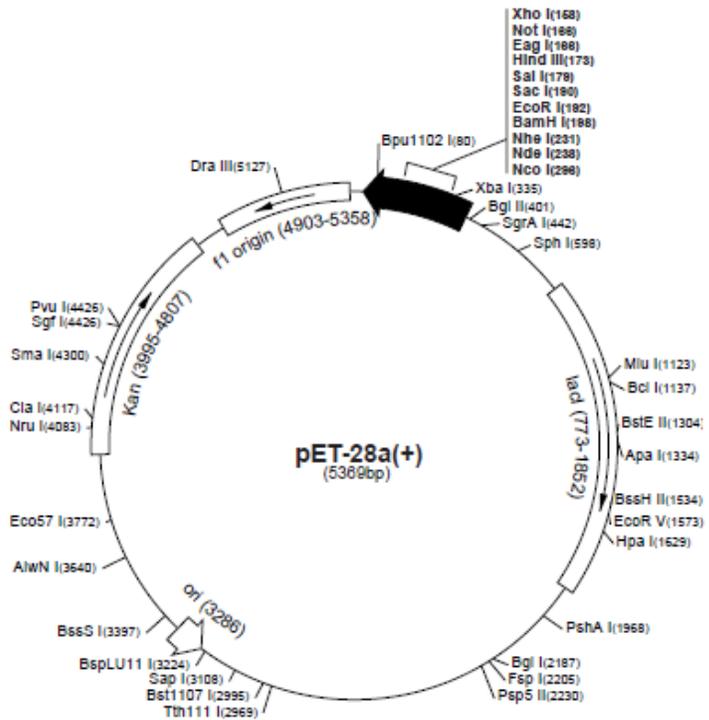
	Cat. No.
pET-28a DNA	69864-3
pET-28b DNA	69865-3
pET-28c DNA	69866-3

The pET-28a-c(+) vectors carry an N-terminal His•Tag<sup>®</sup>/thrombin/T7•Tag<sup>®</sup> configuration plus an optional C-terminal His•Tag sequence. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below. The f1 origin is oriented so that infection with helper phage will produce virions containing single-stranded DNA that corresponds to the coding strand. Therefore, single-stranded sequencing should be performed using the T7 terminator primer (Cat. No. 69337-3).

#### pET-28a(+) sequence landmarks

T7 promoter	370-386
T7 transcription start	369
His•Tag coding sequence	270-287
T7•Tag coding sequence	207-239
Multiple cloning sites ( <i>Bam</i> H I - <i>Xho</i> I)	158-203
His•Tag coding sequence	140-157
T7 terminator	26-72
<i>lac</i> I coding sequence	773-1852
pBR322 origin	3286
Kan coding sequence	3995-4807
f1 origin	4903-5358

The maps for pET-28b(+) and pET-28c(+) are the same as pET-28a(+) (shown) with the following exceptions: pET-28b(+) is a 5368bp plasmid; subtract 1bp from each site beyond *Bam*H I at 198. pET-28c(+) is a 5367bp plasmid; subtract 2bp from each site beyond *Bam*H I at 198.



## ANEXO 4

### Método de replegamiento de la albúmina

Para lograr solubilizar la albumina de ratón concentrada en Buffer A + urea 8M, se utilizó una modificación de la técnica de replegamiento usada por Chen y colaboradores, 1992. Esta técnica adaptada de “replegamiento”, consistió en la eliminación pausada de la urea contenida en el buffer donde se encuentra resuspendida la proteína. Para eliminar la urea totalmente del medio donde se encuentra la proteína de interés se usaron soluciones buffer con concentraciones de urea decrecientes que fueron pasadas a través del sistema AMICON® Stirred Cell (EMD Millipore) (figura 39). Este sistema incluyó el uso de una membrana de 10 kDa de tamaño de poro que garantizó que la albúmina murina de 67 kDa permanezca en la parte superior de la membrana, y la urea sea filtrada. De esta manera, a medida se fueron agregando nuevas soluciones buffer con urea a concentraciones decrecientes, la urea fue siendo retirada de la solución de suspensión de proteína, pausadamente. Por último, la proteína fue resuspendida en una solución buffer sin urea que contenía los mismos componentes de las soluciones buffer usados anteriormente para garantizar la estabilidad de la proteína.

A continuación, se muestra una tabla que detalla todas las soluciones buffer que fueron usadas en el ensayo de replegamiento. Además, se incluye la composición de cada una de estas soluciones.

BUFFER (volumen de 500ml)	COMPOSICIÓN				
	Buffer Tris- HCl Ph 8 1M	UREA (gramos)	pH final	Glicerol (mililitros)	H2O miliQ
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 8M	10 ml	240 g	8.0	0 ml	Colocar 300 ml en el frasco, medir pH y, finalmente, enrasar a 500 ml de volumen final.
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 7M	10 ml	210.21 g	8.0	0 ml	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 6M	10 ml	180.18 g	8.0	0 ml	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 5M	10 ml	150.15 g	8.0	0 ml	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 4M	10 ml	120.12 g	8.0	0 ml.	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 3M	10 ml	90.09 g	8.0	0 ml	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 2M	10 ml	60.06 g	8.0	0 ml	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, urea 1M	10 ml	30 g	8.0	0 ml	
Buffer 20 mM Tris- HCl, pH 8, glicerol 20%.	10 ml	0 g	8.0	100 ml.	

El sistema AMICON® Stirred Cell (EMD Millipore) de 50 ml de capacidad fue ensamblado junto con el sistema de concentración en una refrigeradora a 4°C. Dentro del sistema AMICON® se colocó una membrana YM-10 de 44.5 mm de diámetro y un tamaño de poro de 10 kDa. Todo el sistema, incluyendo la membrana, fueron previamente lavados en agua hervida 3 veces, antes de ser colocados en el interior de la refrigeradora.

Inicialmente, se colocó dentro del sistema todo el contenido de albumina de ratón resuspendida en buffer A + urea 8M, aproximadamente 5 ml de solución de proteína. Seguidamente, se colocaron 200 ml de Buffer 20 mM Tris-HCl, pH 8, Urea 7M, para no exceder la capacidad del AMICON® en cantidades de 45 ml, aproximadamente. Se aperturó la llave de gas nitrógeno que sirvió para ejercer la presión. Se dejó reposar el sistema en agitación hasta que solo 8 ml de solución queden en la parte superior de la

membrana para evitar que ésta se seque. Posteriormente, se agregó la siguiente solución buffer 20 mM Tris-HCl, pH 8, Urea 6M en un volumen de 200 ml, a cantidades de 45 ml aproximadamente. Se repitieron los pasos anteriormente descritos y se ejecutó la misma técnica para el resto de soluciones buffer, asegurándose que la concentración de urea fuese colocada siempre de manera decreciente, hasta resuspender finalmente en 4 ml de buffer 20 mM Tris-HCl, pH 8, glicerol 20%.

Para controlar la calidad del ensayo de replegamiento, se tomaron muestras de la proteína suspendida con los distintos buffer durante todo el ensayo. El ensayo tuvo una duración aproximada de 9 días, durante los cuales se tomaron estas pequeñas muestras para ser observadas usando electroforesis SDS-PAGE en geles al 12%. De igual manera, se tomaron muestras del eluido de la membrana, es decir, de la solución que pasó a través de la membrana de 10 kDa, con la intención de observar si la proteína a pesar de su tamaño fue capaz de pasar los poros de la membrana. Finalmente, se determinó la concentración final de la proteína eluida en buffer sin urea usando el método de Bradford.



**Figura 39.** Sistema AMICON® Stirred Cell (EMD Millipore)

## ANEXO 5

### Ensayo de Absorción Atómica

Para medir la concentración de zinc en las diferentes soluciones de trabajo, antes y después de pasar a través de la membrana del AMICON, se utilizó un espectrofotómetro de Absorción Atómica de marca Perkin Elmer, modelo AAnalyst 200 ubicado en el primer piso de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo de la UPCH. Este modelo se caracteriza por tener una lámpara de descarga de cátodo hueco como fuente de radiación de una longitud de onda de 213.86 nm para la detección de zinc, sistema quemador de aire/acetileno que alcanza temperaturas de hasta 2300°C, nebulizador para contribuir a la atomización de la muestra, sistema óptico Echelle de doble haz para compensar cambios en la intensidad de la lámpara durante el análisis y mejorar la “performance” del ensayo, un sistema detector de estado sólido, y una lámpara de detección específica de zinc (figura 40). Las diferentes soluciones de trabajo fueron tomadas usando un capilar para aspirar la muestra, y los resultados de la concentración de zinc en las diferentes soluciones fueron entregados en mM y unidades de Absorbancia.



**Figura 40.** Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin Elmer AAnalyst 200.

## ANEXO 6

### Protocolo de necropsia

La necropsia se realizará 15 días después de culminado el tratamiento. Los tejidos recolectados serán corazón, hígado, cerebro, riñón, intestino delgado, intestino grueso, hígado, músculo y piel, los cuales serán conservados en PBS-formolado al 10%.

Los animales serán eutanasiados administrando vía intraperitoneal de 20mg/kg de ketamina (Ket-A-10®, mg/Kg, sedante) y 5mg/kg de clorhidrato de xylazina (Dormi-Xyl®2, mg/Kg, analgésico y relajante muscular) que juntos nos proporcionaran anestesia general del animal. Luego por punción cardiaca se administrará una sobredosis de pentobarbital sódico (Halatal) en una dosis de 70 mg/kg; hipnótico y anticonvulsivante que en sobredosis producirá un paro cardio-respiratorio lo que llevará a la muerte del animal.

Si se requiere extraer sangre del corazón al momento de la necropsia se utilizará una jeringa de tuberculina. Una vez anestesiado el animal, colocar al ratón en posición de cúbito dorsal y fijar las extremidades a la mesa con cinta maskintape. Luego, desinfectar la cavidad torácica utilizando agua oxigenada, yodo povidona y vanodine, repetir esta operación tres veces en ese mismo orden. Seguidamente con el dedo índice ubicar los latidos cardiacos e introducir la aguja levemente a 90°, suavemente jalar el émbolo. Al finalizar aproximadamente con 0,5ml de sangre, retirar suavemente la jeringa y administrar la inyección letal por punción cardiaca. Verificar que el ratón esté eutanasiado, revisando que no exista latido cardiaco ni reflejo. Por último descartar los restos colocándolos en una bolsa para autoclave. Descartar las agujas en un descartador para punzocortantes. Desinfectar la zona de trabajo con lejía 10%.

## ANEXO 7

### Secuencia de nucleótidos optimizada del gen de albúmina de ratón con epítipo transplantado y secuencia de aminoácidos resultante de su traducción

**NcoI**  
CCATGG AAGCGCATAAAAGCGAAATGCGCATCGCTATAACGATCTGGGCGAACAGCATTTTAAAGGCTGGTGC  
TGATTGCGTTTAGCCAGTATCTGCAGAAATGCAGCTATGATGAACATGCGAAACTGGTGCAGGAAGTGACCGATT  
TTGCGAAAACCTGCGTGGCGGATGAAAGCGCGCGAACTGCGATAAAAGCCTGCATACCTGTTTGGCGATAAAC  
TGTGCGCGATCCGAACTGCGCGAAAATAAGCGAACTGGCGGATTGCTGCACCAAACAGGAACCGGAACGCG  
AACGAATGCTTTCTGCAGCATAAAGATGATAACCCGAGCCTGCCCGTTTGAACGCCGGAAGCGGAAGCGATG  
TGCACCAGCTTTAAAGAAAACCGACCACCTTTATGGGCCATTATCTGCATGAAGTGGCGCGCCGCCATCCGTATT  
TTTATGCGCGGAACTGCTGTATTATGCGGAACAGTATAACGAAATTCTGACCCAGTCTGC GCGGAAGCGGATA  
AAGAAAGCTGCTGACCCCGAACTGGATGGCGTGAAGAAAAAGCGCTGGTGAAGCAGCGTGCAGCGGCGCATG  
AAATGCAGCAGCATGCAGAAATTTGGCGAACGCGCTTTAAAGCGTGGGCGGTGGCGCGCTGAGCCAGACCTT  
TCCGAAACGCGGATTTTGGCGAAATACCAAATGGCGACCGATCTGACCAAAGTGAACAAAGAAATGCTGCCA GGG  
CGATCTGCTGGAATGCGCGGATGATCGCGCGAACTGGCGAAATATATGTGCGAAAACAGGCGACCATAGCA  
GCAAATGCAGACTGCTGCGATAAACCGCTGCTGAAAAAGCGCATTGCTGAGCGAAGTGGAACATGATACCA  
TGCCGGCGGATGCGCGCGATTGCGCGGATTTTGTGGAAGATCAGGAAGTGTGCAAAAATATGCGGAAGCG  
AAAAGATGTGTTTCTGGGACCTTTCTGTATGAATATAGCCGCGCCATCCG GATTATAGCGTGAGCCTGCTGTC  
GCCTGGCGAAAAAATATGAAGCGACCTGGAAAAATGCTGCGCGGAAGCGAAACCCGCGCGTGTATGGCACC  
GTGCTGGCGGAATTTAGCCGCTGGTGAAGAACCGAAAAACCTGGTGAACCAACTGCGATCTGTATGAAAA  
CTGGGCGAATATGGCTTTCAGAACCGGATTTCTGGTGCCTATACCCAGAAAGCGCCGAGGTGAGCACCCCGACC  
CTGGTGAAGCGCGCGCAACTGGCCGCTGGGCACCAAATGCTGCACCTGCGGGAAGATCAGCGCCTGCC  
GTGCGTGAAGATTATCTGAGCGGATTTCTGAACCGCTGTGCCTGCTGCATGAAAAACCCGGTGAAGCA  
TGTGACCAAATGCTGAGCGGACGCTGTGGAAACGCGCCCGTGTTTAGCGCGTGACCGTGAAAGCGTATAG  
CAACTGCTATCCGTATGATGTGCCGATTATACCTTTCATAGCGATATTTGACCCCTGCCGAAAAAGAAAAACAG  
ATTAAAAAACAGACCGCGTGGCGGAACTGGTGAACATAAACCGAAAGCGACCGCGGAACAGCTGAAAAACCGT  
GATGGATGATTTTGGCAGTTTCTGGATCCTGCTGCAAGCGGCGGATAAAGATACTGCTTTAGCACCGAAGG  
CCGAACTGGTGACCCGCTGCAAGATGCGCTGGCGCTCGAG CACCACCAACCACCACTGA

XhoI

MEAHKSEIAHRYNDLGEQHFQKGLVLIQKSYDEHAKLVQEVDFAKTCVADESAANCDKSLHLFGDKLCAIP  
NLRENYGELADCCTKQEPERNECFQHKDDNPSPFFERPEAEAMCTSFKENPTTFMGHYLHEVARRHPYFYAPELLY  
AEQYNEILTQCCAEADKESCLTPKLDGVKEKALVSSVRQRMKCSSMQKFGERAFKAWAVARLSQTFPNADF AIEIKLAT  
DLTKVNEKCECHGDLLECAADDRAELAKYMCENQATISSKLQTCCKP LLLKKAHCLSEVEHDTMPADLPAIAADFVEDQEV  
CKNYAEAKDVFQKAPQVSTPTLVEARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCC  
KLG EYGFQNAI L VRYTQKAPQVSTPTLVEARNLGRVGTCCCTLPEDQRLPCVEDYLSAILNRVCLLHEKTPVSEHVTKCC  
SGSLVERRPCFSALTVKAYSNCYPYDVPDYTFHSDICTLPEKEKQIKKQALAEVLVHKPKATAEQLKTVMDDFQFLDTC  
CKAADKDTCFSTEGPNLVTRCKDALALEHHHHHH

XhoI