



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

DISEÑO DE UN CANDIDATO A VACUNA CONTRA DENGUE Y ZIKA BASADO  
EN UN MIMÓTOPO DEL EPÍTOPO EDE

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctora en Ciencias

PRESENTA:

M.C. ESMERALDA CUEVAS JUÁREZ

TUTOR PRINCIPAL

Dra. LAURA A. PALOMARES

[Instituto de Biotecnología](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. CONSTANTINO III LÓPEZ MACÍAS (IMSS)

Dr. ERNESTO ORTIZ SURÍ (IBT)

Dra. ROSA VICTORIA PANDO ROBLES (INSP), Tutora invitada

Cuernavaca, Morelos, México. Junio de 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Este trabajo se realizó gracias al apoyo de PAPIIT-UNAM proyectos IT200521 e IT200418, AMEXCID-SRE y SECTEI. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de doctorado otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACYT (308583).

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS .....	6
RESUMEN.....	7
I. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 El virus Zika y dengue.....	9
1.1.1 Estructura .....	9
1.1.2 Las proteínas de la envoltura: E y prM/M .....	10
1.1.3 Replicación viral.....	11
1.2. El virus Zika y virus dengue: la enfermedad .....	13
1.2.1. Amplificación mediada por anticuerpos .....	14
II. ANTECEDENTES.....	17
2.1 Vacunas contra dengue y Zika y estrategias para evitar la AMA .....	17
2.2 El epítopo EDE .....	19
2.3 El anticuerpo EDE1 C8 .....	21
2.4 Mimótopos .....	21
2.5 El virus adeno-asociado como acarreador de epítomos.....	22
III. HIPÓTESIS .....	25
IV. OBJETIVOS.....	25
4.1. Objetivo general.....	25
4.2. Objetivos específicos.....	25
V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	26
5.1 Producción y caracterización del anticuerpo EDE1 C8.....	26
5.1.1. Generación de células CHO-S productoras del anticuerpo EDE1 C8 .....	26
5.1.2. Producción y purificación del anticuerpo EDE1 C8.....	27
5.1.3. Western blot del anticuerpo EDE1 C8.....	28
5.1.4. Dot-blot.....	28
5.2. Descubrimiento de mimótopos mediante despliegue en fagos .....	29
5.2.1 Rondas de selección o enriquecimiento .....	29
5.2.2. Titulación del bacteriófago M13 .....	30
5.2.3. ELISA para selección de clonas .....	31
5.2.4. Secuenciación de las clonas seleccionadas .....	32
5.2.5. Alineamientos de las secuencias.....	33
5.3 Trabajando con péptidos.....	33
5.3.1. Dicroísmo circular .....	33

5.3.2. ELISA de los péptidos libres.....	33
5.3.3. Conjugación química de los mimótopos a proteínas acarreadoras.....	34
5.3.4. Análisis de los conjugados por HPLC fase reversa.....	35
5.4 Trabajando con los virus dengue y Zika.....	35
5.4.1. Propagación e inactivación de los virus dengue y Zika.....	35
5.4.2 Titulación de los virus dengue y Zika.....	36
5.5 Sistema de despliegue en el virus adeno-asociado.....	37
5.5.1. Amplificación y clonación del gen Cap del AAV2.....	37
5.5.2. Modificación del gen Cap con los sitios NotI y SgfI.....	37
5.5.3. Clonación de las secuencias codificantes de los mimótopos.....	38
5.5.4. Obtención de bácmidos recombinantes.....	39
5.5.5. Transfección de células SF9.....	40
5.5.6. Ensayo en placa.....	41
5.5.7. Titulación de los baculovirus.....	42
5.5.8. Producción y purificación de VLPs de AAV.....	43
5.5.9. Protocolo modificado para extracción de Cap-M1.....	44
5.5.10. Western blot de las proteínas estructurales del AAV.....	44
5.5.11. Microscopía electrónica de transmisión.....	44
5.5.12. Criomicroscopía electrónica.....	45
5.6. Experimentos con animales.....	45
5.6.1. Inmunización con fagopéptidos y mimótopos libres.....	45
5.6.2. Determinación de anticuerpos anti-Zika, anti-M13 y anti-mimótopos por ELISA.....	45
5.6.3. Inmunizaciones con las VLPs modificadas.....	46
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1 Producción del anticuerpo EDE1 C8.....	47
6.2. Descubrimiento de mimótopos mediante despliegue en fagos.....	53
6.3 Análisis de la estructura secundaria de los mimótopos y reconocimiento por el EDE1 C8 ...	60
6.4. Inmunizaciones con los fagopéptidos en combinación con los mimótopos libres.....	63
6.5 Conjugación de los mimótopos a proteínas acarreadoras.....	64
6.5.1. Conjugación de los mimótopos por métodos químicos a VP6 y BSA.....	64
6.5.2. Despliegue de los mimótopos en la cápside del AAV2.....	71
6.5.2.1 Caracterización de las VLPs.....	90
6.5.2.2 Inmunización y evaluación de la respuesta de anticuerpos.....	96
VII. CONCLUSIONES.....	99
VIII. PERSPECTIVAS.....	101

IX. ANEXOS.....	102
ANEXO 1: SECUENCIA COMPLETA DEL ANTICUERPO EDE1 C8 PRODUCIDO.....	102
ANEXO 2. LISTA DE PUBLICACIONES .....	105
X. REFERENCIAS.....	106

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura A. Palomares Aguilera, por aceptarme en su grupo de investigación, por ser mi tutora, por su confianza y darme tantas oportunidades, y empujones, para desarrollarme y crecer.

A los miembros de mi Comité Tutoral, Dr. Ernesto Ortiz Suri, Dr. Constantino López Macías y Dra. Rosa Victoria Pando Robles; por sus valiosas aportaciones a este trabajo de investigación y a mi formación como doctora.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich, por aceptarme dentro de su consorcio de investigación y por sus comentarios que enriquecieron este trabajo.

A la Dra. Ana Alcalá por dedicar parte de su tiempo a entrenarme y compartir su conocimiento en el tema.

A las técnicas académicas del grupo: M.C. Martha Alicia Contreras, M.C. Ruth Pastor Flores y M.C. Vanessa Hernández Rodríguez, quienes aportaron su experiencia y apoyaron en los experimentos.

A los compañeros del laboratorio que aportaron su experiencia y conocimiento en el tema: Arturo Liñan, Enrique Paz, Alberto Porras, David Moreno, Michelle Gutiérrez, Dubhe Bulté y Juan Carlos Rivera.

A los miembros del jurado.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT.

A la Unidad de Bioterio del IBT.

A la Dra. Gloria Saab por los análisis de difracción circular.

A Mario Trejo y Martín Patiño por el apoyo en la redacción de la patente.

A la unidad de cómputo y Biblioteca del IBT.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por el apoyo económico para asistir a un curso y un congreso internacional.

## RESUMEN

Actualmente, se dispone de sólo una vacuna contra dengue; y no se dispone de una vacuna contra Zika. Debido a la similitud entre estos flavivirus, surge la interrogante de si una vacuna contra dengue o Zika podría estimular la producción de anticuerpos de reactividad cruzada que den lugar al fenómeno adverso de amplificación mediada por anticuerpos. Por ello, resulta necesario desarrollar una vacuna que funcione contra ambos virus, sin tener efectos no deseables; algo que podría lograrse mediante un diseño racional en el cual se tomen en cuenta sólo los epítomos de los virus que den lugar anticuerpos neutralizantes para ambos.

En el presente estudio se investigó el desarrollo de un candidato a vacuna contra dengue y Zika que esté basado en el epítomo EDE, un epítomo conservado y que da lugar a anticuerpos neutralizantes contra ambos virus. Específicamente, se estudió la obtención de mimótopos, péptidos capaces de emular un epítomo. Para ello, primero se generaron líneas celulares CHO que producen el anticuerpo monoclonal EDE1 C8, dirigido al epítomo EDE. El anticuerpo se purificó de manera exitosa del sobrenadante del cultivo celular; y se corroboró que reconoce y neutraliza los virus Zika y dengue. Usando el anticuerpo producido, se examinó una biblioteca de péptidos desplegados en fagos. Después de tres rondas de selección, se analizaron placas individuales, lográndose identificar 26 placas que fueron reconocidas por el anticuerpo. Después de la secuenciación de 20 placas, se encontraron 3 secuencias de péptidos representados varias veces en las placas secuenciadas. Los alineamientos de las secuencias de los péptidos con las proteínas E de dengue y Zika mostraron que sólo el péptido 2 conserva algunos aminoácidos conservados con regiones puntuales de la proteína E, las cuales son importantes para el reconocimiento por el anticuerpo.

Los análisis llevados a cabo con los péptidos libres sintéticos demostraron que éstos perdieron su estructura al estar en forma de péptidos libres y no unidos al fago. Debido a esto, los péptidos libres no fueron reconocidos por el anticuerpo, a diferencia de los péptidos desplegados en el fago. Además, la inmunización de ratones Balb/c con los péptidos desplegados en el fago no indujo la producción de anticuerpos contra los péptidos, esto debido al bajo número de copias del péptido en el fago.

Se desarrollaron dos estrategias para desplegar los péptidos en un sistema que nos permitiera aumentar el número de copias de péptido por partícula y conservar su estructura. De la conjugación química a proteínas acarreadoras y el despliegue en partículas pseudovirales de virus adeno-asociado, la segunda estrategia mostró resultados positivos. Los péptidos desplegados en las partículas fueron reconocidos por el anticuerpo EDE1 C8. La caracterización estructural de estas partículas mostró que



éstas se encuentran ensambladas en partículas de alrededor de 30 nm con simetría icosaédrica y que despliegan los péptidos en la superficie, de forma ordenada y repetitiva.

Se estudió la producción de las partículas pseudovirales en cultivo celular, encontrándose que, dependiendo de la secuencia con la que se modifiquen las partículas, es necesario aplicar diferentes estrategias durante su producción. Así, se optimizó el tiempo de cultivo, multiplicidad de infección y adición de inhibidores de proteasas, con el fin de producir las partículas en suficiente cantidad para llevar a cabo experimentos en ratones.

La inmunización de ratones Balb/c con las partículas pseudovirales que despliegan el péptido 2 indujo anticuerpos que reconocen dengue y Zika. Las diferencias entre el péptido 2 y el resto de los mimótopos, nos permitió hacer inferencias acerca de los residuos importantes durante el desarrollo de un mimótopo del EDE. Con esto, en conjunto con la información obtenida acerca del uso del virus adeno-asociado como sistema de despliegue de epítomos, concluimos que sería posible tener una vacuna que consista en mimótopos optimizados desplegados en estas partículas pseudovirales. Este estudio constituye la primera prueba de concepto para el desarrollo de una vacuna contra dengue y Zika que esté basada exclusivamente en el epítomo EDE y que elimine, potencialmente, el efecto de amplificación mediada por anticuerpos.

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 El virus Zika y dengue

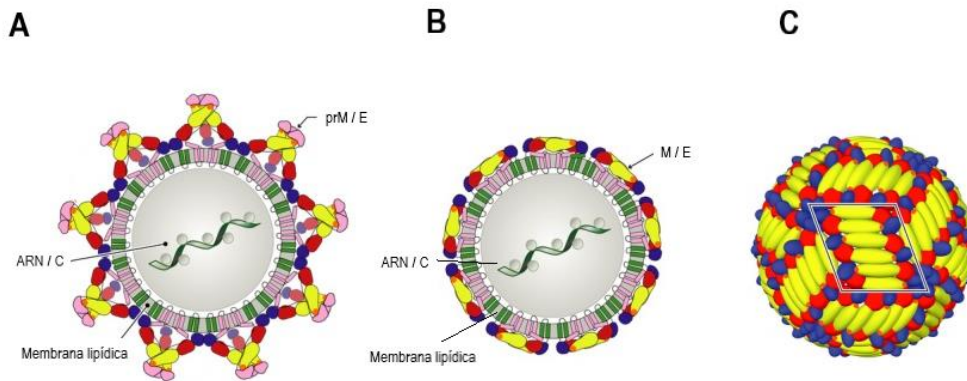
### 1.1.1 Estructura

Los flavivirus, grupo en el cual se incluyen los virus del Zika y dengue, poseen un genoma de ARN monocatenario positivo. Son virus envueltos en los cuales el genoma, de aproximadamente once kilobases, está acomplejado con múltiples copias de la proteína C (nucleocápside), y rodeado de una membrana lipídica a la cual están ancladas la proteína de la envoltura (E) y proteína de la membrana (M) (figura 1). El genoma codifica una poliproteína única que es procesada de forma postraduccional para dar lugar a tres proteínas estructurales (C, E y prM/M) que forman la partícula viral; y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5); que están involucradas en la replicación, ensamblaje y evasión de la respuesta inmune del hospedero.

Los virus maduros son partículas de superficie lisa de 40-50 nm; y tienen un arreglo icosaédrico con número de triangulación de 3. En la superficie, 90 homodímeros de proteína E, en distribución de tipo cabeza-cola, se acomplejan a su vez con dímeros de proteína M. Estos dímeros yacen en la membrana viral en agrupaciones de 3, dando lugar a 30 grupos, o balsas, por su semejanza con las balsas lipídicas de las membranas celulares (figura 1C).

Los virus generados durante una infección deben pasar por un proceso de maduración, como se detalla en la siguiente sección. Debido a esto, las partículas virales son una mezcla de virus con diferente grado de maduración, debido a que el corte por la proteasa furina no se da en el 100% de las copias de la proteína M (figura 1A y B). Además, los flavivirus como dengue y Zika son partículas bastante dinámicas que presentan cambios conformacionales orquestados en su superficie, aún en las partículas maduras, a este fenómeno se le conoce como respiración viral (*breathing*, en inglés). Ambos fenómenos tienen un efecto importante en procesos como el reconocimiento y neutralización por anticuerpos (Kuhn, Dowd, Beth Post, & Pierson, 2015).

Las proteínas E y prM/M, localizadas en la superficie viral, juegan un papel fundamental durante la infección y en la generación de la respuesta inmune contra flavivirus, es por ello que su estructura y función se detallan a continuación.



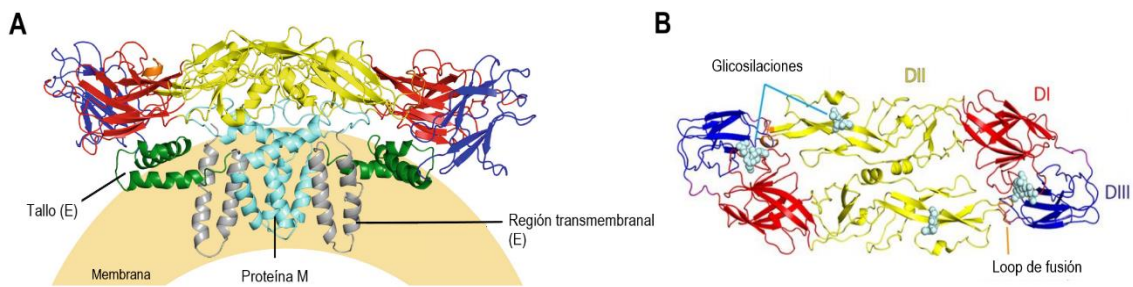
**Figura 1. Estructura de los virus dengue y Zika en su forma inmadura (A), madura (B) y superficie de los virus maduros, mostrando una balsa de proteínas E y M (C). Se muestran los dominios DI (rojo), DII (amarillo), DIII (azul) y región tallo/transmembranal (verde) de la proteína E; así como la proteína prM/M en rosa. Tomada y modificada de Rey, Stiasny, Vaney, Dellarole, & Heinz, (2018).**

### 1.1.2 Las proteínas de la envoltura: E y prM/M

La proteína E es una proteína de fusión tipo II de alrededor de 50 kDa. Está formada por una región transmembranal que, como su nombre lo dice, se encuentra embebida en la membrana del virus, y su función es anclar la proteína a la membrana viral; y un ectodominio que se encuentra en la superficie del virus. Ambas regiones están unidas por una región tipo tallo. El ectodominio a su vez está formado por tres dominios denominados DI, DII y DIII (figura 2).

El DI se localiza en el extremo N-terminal de la proteína y tiene un plegamiento de barril  $\beta$  que le permite estabilizar la orientación de la proteína y actuar como una bisagra durante los cambios conformacionales. También contiene los sitios de glicosilación en la Asn 153 para dengue, y Asn 154 para ZIKV. El DII es un dominio de dimerización tipo dedo que participa en la estabilización del dímero de proteína E. Contiene un lazo (o fusion loop, por su nombre en inglés) en un extremo, estabilizado por un puente disulfuro, que participa como péptido de fusión durante la fusión de las membranas viral y endosomal y está sumamente conservado entre flavivirus. En este dominio (Asn 67) se localiza el segundo sitio de glicosilación de la proteína E de dengue, ausente en Zika. El DIII es un dominio tipo inmunoglobulina localizado hacia el extremo C-terminal de la proteína y donde se encuentran los sitios de unión al receptor (Zhang et al., 2017).

La proteína M es sintetizada como un precursor, prM, que es escindido por la proteasa furina, liberando el péptido pr. Es una proteína pequeña de alrededor de 21 kDa y se localiza en forma de dímeros en la superficie viral, asociada a los dímeros de proteína E. Posee, al igual que la proteína E, una región transmembranal y un ectodominio, unidos por una región tipo tallo (figura 2A). La función del péptido pr es cubrir el loop de fusión de la proteína E, protegiéndola de una fusión temprana con las membranas de la vía secretoria durante el transporte de las partículas nuevas al exterior celular. La proteína M, por su parte, actúa como chaperona, al ayudar durante el plegamiento de la proteína E y ensamblaje de nuevas partículas; además de participar en los cambios conformacionales requeridos durante la entrada del virus a la célula y durante la secreción de nuevas partículas (Konishi & Mason, 1993; Yoshii et al., 2012).



**Figura 2. Estructura de las proteínas E y M, vista lateral (A) y desde arriba (B). Tomada y modificada de Heinz & Stiasny, (2018).**

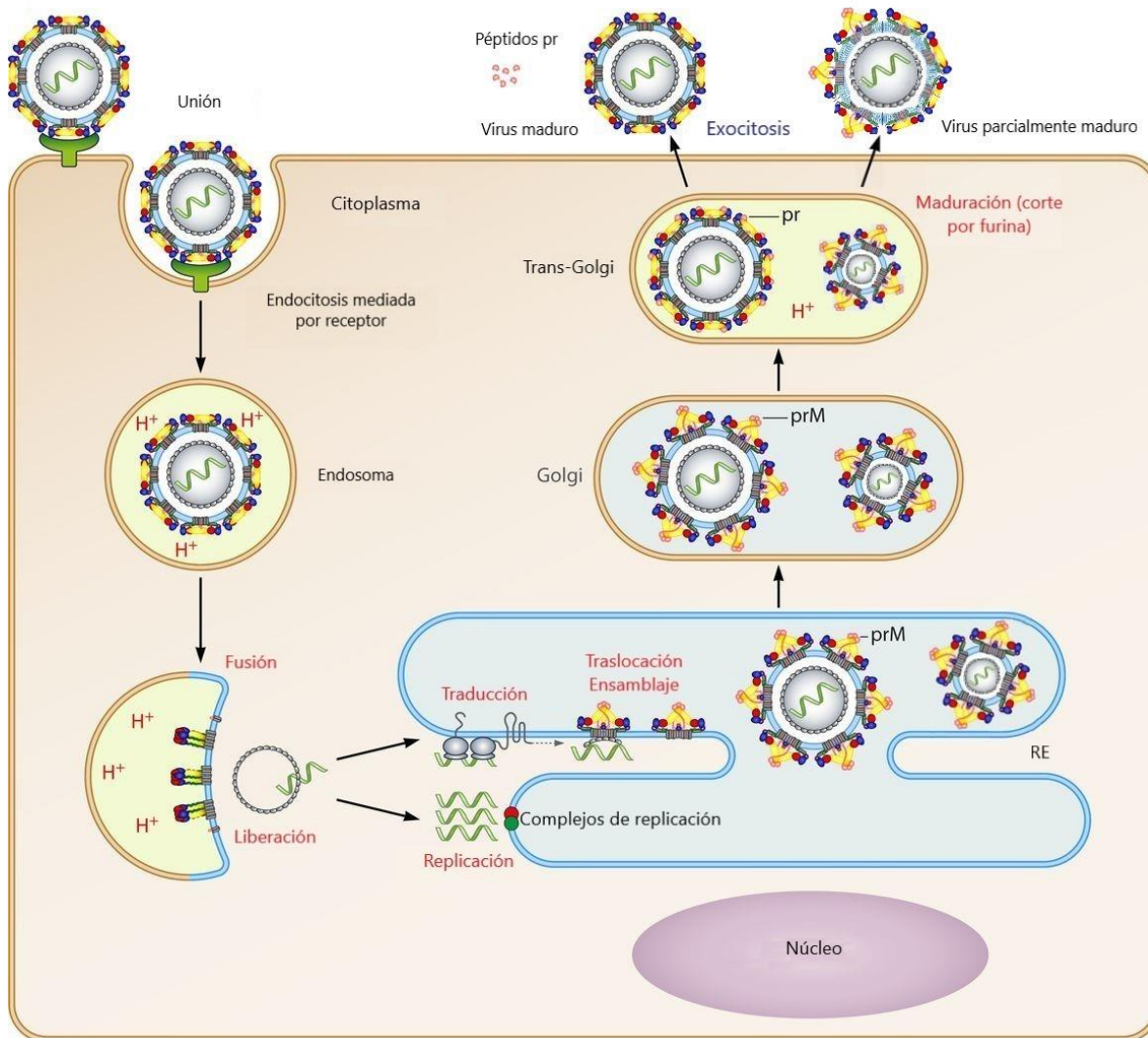
### 1.1.3 Replicación viral

Las principales células blanco de dengue y Zika son los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas, donde se une a glicosaminoglicanos cargados negativamente, como el heparán sulfato. También se ha reportado unión a receptores lectina tipo C, como el receptor de manosa y la molécula de adhesión intercelular de las células dendríticas (DC-SIGN) (Rodenhuis-Zybert, Wilschut, & Smit, 2010). Después de la unión al receptor, el virus es internalizado, al parecer por un mecanismo de endocitosis mediada por clatrina; aunque se ha reportado también un mecanismo de macropinocitosis (Cruz-Oliveira et al., 2015). Dentro del endosoma, los homodímeros de proteína E se disocian debido al pH ácido y el loop de fusión se inserta en la membrana endosomal. Esto desencadena la formación de trímeros de proteína E, el dominio III de esta proteína se pliega hacia el *loop* de fusión y se forma una estructura tipo *hairpin*; la cual acerca la membrana viral hacia la

membrana endosomal, obligándolas a fusionarse y liberando la nucleocápside al citosol (Rodenhuis-Zybert et al., 2010) (figura 3).

Una vez en el citosol, la nucleocápside se disocia, dejando al descubierto el RNA para ser traducido por los ribosomas en la superficie del retículo endoplásmico (RE). Las proteínas E y prM son trasladadas hacia el lumen del RE; mientras que la proteína C permanece en el lado citosólico. Las proteínas no estructurales del virus inician la replicación del RNA en invaginaciones formadas por la membrana del RE, donde se forman los complejos de replicación. Una vez replicado, el RNA se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside, la cual gema al lumen del RE; adquiriendo en este paso su membrana lipídica, donde las proteínas E y prM están ancladas. Estos virus están formados por heterodímeros de las proteínas prM/E, que se organizan a su vez en trímeros, formando puntas que sobresalen de la partícula, esto hace que estas partículas midan un poco más que el virus maduro (60 nm vs. 50 nm). Estas partículas no son infecciosas y migran a través de la vía secretora (Mukhopadhyay, Kuhn, & Rossmann, 2005).

En el aparato de Golgi ocurre la maduración del virus, pues el pH ácido desencadena la disociación de los heterodímeros E/prM y da lugar a la formación de homodímeros de proteína E que se asocian a su vez con dímeros de proteína prM, en un cambio conformacional reversible. Sin embargo, este cambio también desencadena la escisión del péptido pr de la proteína prM, por la proteasa furina. Antes de ser escindido, el péptido pr cubre al loop de fusión de la proteína E, protegiéndola de una fusión temprana. Si el péptido pr no es escindido, el loop de fusión queda bloqueado para realizar la fusión con la membrana endosomal y la nucleocápside no puede ser liberada al citosol durante una infección, por lo tanto, el corte proteolítico por la proteasa furina no sólo genera la forma madura de la proteína M, si no que genera a las partículas virales infecciosas. Después de este corte, la asociación de la proteína E en dímeros es irreversible (Rey et al., 2018). El péptido pr queda unido a las partículas mientras continúe el pH ácido, pero es liberado en el pH neutro del exterior celular, dejando las partículas maduras listas para infectar otra célula (figura 3).



**Figura 3. Ciclo de vida de los virus dengue y Zika. Tomada y modificada de Franz X Heinz & Stiasny, (2017).**

## 1.2. El virus Zika y virus dengue: la enfermedad

Los virus del Zika y del dengue son causantes de enfermedades infecciosas conocidas como fiebre por dengue y fiebre por Zika. Estos virus son transmitidos a humanos por la picadura de las hembras de mosquito *Aedes aegypti* infectadas. En el caso de Zika, se ha descrito que también se puede transmitir de forma sexual, ya que el virus puede encontrarse más de un mes después en el semen de individuos infectados (Medina et al., 2018; Turmel et al., 2016); además, si una mujer embarazada es infectada, el virus puede transmitirse al feto (transmisión vertical) (de Araújo et al., 2018).

La mayoría de infecciones (75-80%) por Zika y dengue son asintomáticas (Haby, Pinart, Elias, & Reveiz, 2018; Schaefer, Panda, & Wolford, 2020). Cuando se desarrollan síntomas, éstos perduran de 2 a 7 días, e incluyen fiebre, dolor de cabeza, sarpullido y dolor muscular y de articulaciones. Adicionalmente, la infección por Zika en mujeres embarazadas se ha asociado al desarrollo de Síndrome Congénito por Zika (de Araújo et al., 2018; Li et al., 2016), que incluye microcefalia y otras afectaciones; y en adultos se ha asociado al desarrollo de síndrome de Guillain-Barré (Malkki, 2016). El dengue, por su parte, también puede dar lugar a formas más graves de la enfermedad, sobre todo cuando se trata de infecciones secundarias por otro serotipo (Whitehead, Blaney, Durbin, & Murphy, 2007). En sus formas más graves, conocidas como dengue con signos de alarma y dengue grave, o se desarrollan hemorragias, pérdida de líquido de los compartimentos vasculares debido a un aumento en la permeabilidad capilar, choque hipovolémico e inclusive la muerte.

Se estima que alrededor de la mitad de la población mundial está en riesgo de contraer dengue, con un incremento del porcentaje en los próximos años (Messina et al., 2019). Debido a que tanto dengue como Zika se transmiten por el mismo vector, este riesgo podría extrapolarse al caso de Zika. En México, se reportaron 41,505 casos de dengue confirmados y 268,458 casos probables; con 191 muertes, sólo en 2019 (DGE, 2020b). Mientras que para Zika, en el período 2015-2020 se reportaron 12,936 casos en México, de los cuales 7,135 fueron en mujeres embarazadas (DGE, 2020a). Se han reportado 3,720 casos confirmados de Síndrome Congénito por Zika en América en el período 2015-2018 (OPS, 2018).

### 1.2.1. Amplificación mediada por anticuerpos

Existen cuatro serotipos del virus dengue y sólo un serotipo del virus Zika. La infección por cualquier serotipo provee inmunidad de por vida contra ese serotipo; por lo que se deduce que una infección por Zika ocurriría sólo una vez en la vida (Dowd et al., 2016). Sin embargo, para el caso de dengue, pueden ocurrir infecciones secundarias por otro serotipo; y es durante las infecciones secundarias que aumenta el riesgo de padecer dengue grave. Esto se ha relacionado con un fenómeno conocido como amplificación mediada por anticuerpos (AMA). Debido a la similitud estructural de los diferentes serotipos de dengue, los anticuerpos generados contra uno pueden reconocer otro serotipo, sin llegar a neutralizarlo. Las células del sistema inmune que expresan los receptores Fc, como neutrófilos, asesinas naturales, monocitos, macrófagos y células dendríticas, pueden internalizar estos complejos virus-anticuerpo durante una infección secundaria, de forma que estos anticuerpos dirigen al virus hacia sus principales células blanco. Una vez dentro de la célula, el virus puede escapar a la neutralización y establecer una infección exitosa, lo cual hace que se libere mayor

carga viral al organismo, debido a que el virus es internalizado más eficientemente por las células, comparado a cuando no hay anticuerpos que reaccionen de forma cruzada, como durante una infección primaria.

El aumento en la producción viral durante la AMA resulta también de la supresión de la respuesta inmune intracelular innata y adaptativa, causada por la internalización de los complejos virus-anticuerpos a través de los receptores Fc $\gamma$ , principalmente. En células THP-1, esta supresión incluye una reducción en la producción de radicales de óxido nítrico (NO), una de las defensas innatas contra la infección por DENV; así como reducción en la secreción de interferón I (IFN I), de las moléculas antivirales activadas por IFN, y de la transcripción y traducción de IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Además, se ha observado un aumento en la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias como IL-6 e IL-10 (Khandia et al., 2018; Ubol & Halstead, 2010). En células U937, se ha observado un incremento en citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  e IL-8, lo cual se ha ligado con la fuga de plasma durante el dengue grave (Khandia et al., 2018). Esta subversión de la respuesta inmune innata ha sido observada también en modelos animales (Costa et al., 2014); así como en sangre y células mononucleares de sangre periférica de pacientes con dengue grave, donde se ha reportado una reducción en la producción de NO e IFN; una regulación negativa de los genes reguladores de IFN; así como un aumento en la producción de IL-10 y TNF- $\alpha$  (Khandia et al., 2018; Ubol & Halstead, 2010). De esta forma, durante la AMA, no sólo se facilita la entrada del virus, si no que se modifica la respuesta inmune antiviral intracelular, lo que resulta en una replicación exacerbada del virus.

El porcentaje de identidad entre las secuencias de proteína E de los cuatro serotipos de dengue varía entre el 63.2 y 77.6%; mientras que el porcentaje de identidad entre la proteína E de Zika y los cuatro serotipos de dengue, varía del 53.9 al 57.8% (Xu et al., 2016). Debido a esta similitud, una de las principales preguntas cuando surgieron los primeros brotes masivos de Zika, fue si se podría presentar el fenómeno de AMA entre dengue y Zika. Para los diferentes serotipos de dengue, ya se ha demostrado una correlación entre un título bajo de anticuerpos y el desarrollo de dengue grave en infecciones secundarias en niños (Leah C Katzelnick et al., 2017); mientras que para la AMA entre Zika y dengue, los resultados son contradictorios. Numerosos reportes han encontrado AMA entre Zika y dengue, usando líneas celulares y modelos de ratones. Durante estos estudios se han usado anticuerpos purificados o suero de pacientes convalecientes de dengue o Zika, y se ha visto que la producción viral y/o la severidad de la enfermedad incrementa cuando están presentes anticuerpos heterotípicos (Dejnirattisai et al., 2016; Stettler et al., 2016). Además, en macacos, se observó amplificación de la infección por dengue cuando éstos eran pre-inmunes a Zika, lo que se reflejó en mayor carga viral e incremento en citocinas proinflamatorias (George et al., 2017). En estudios con



ratonas en gestación, se observó que los anticuerpos maternos contra dengue incrementaron la infección con Zika de los embriones (Rathore, Saron, Lim, Jahan, & John, 2019), y viceversa, los anticuerpos contra Zika incrementaron la infección con dengue de las crías (Fowler et al., 2018). Recientemente, además, se reportó que una infección primaria con Zika aumenta el riesgo de desarrollar dengue grave en humanos (L.C. Katzelnick et al., 2020). Sin embargo; varios estudios no han encontrado AMA de Zika en macacos preinmunes a dengue, o viceversa (Breitbach et al., 2019; McCracken et al., 2017; Pantoja et al., 2017). Y en un estudio con 35 pacientes infectados con Zika, previamente expuestos a dengue, no se observó diferencia en la carga viral ni en la respuesta de citocinas, comparado con el grupo control (Terzian et al., 2017). Por lo tanto, todavía se requieren estudios en humanos, con un mayor número de pacientes, a fin de tener más información sobre el papel de los anticuerpos generados en una primera infección durante una infección secundaria con dengue o Zika. Mientras tanto, el efecto AMA no puede descartarse y debería tomarse en cuenta para el diseño de cualquier terapia con anticuerpos o vacuna contra estos flavivirus.

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 Vacunas contra dengue y Zika y estrategias para evitar la AMA

En general, la estrategia para el diseño de vacunas contra dengue y Zika, contempla el uso de las proteínas estructurales prM y E, o el virus completo; ya que la proteína E es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes; y se ha observado un correlato de protección con altos títulos de anticuerpos neutralizantes (Diamond, Ledgerwood, & Pierson, 2019). Por su parte, la expresión conjunta de la proteína prM/M con la proteína E, favorece la correcta expresión y secreción de la proteína E en sistemas heterólogos (Takahashi, Ohtaki, Maeda-sato, Tanaka, & Tanaka, 2009). Sin embargo, los anticuerpos dirigidos a la proteína prM/M han sido asociados con el fenómeno AMA (Dejnirattisai et al., 2010), y debería evitarse su uso en una vacuna que tenga como fin evitar este fenómeno.

Al ser el principal blanco de la respuesta inmune humoral, se han mapeado numerosos epítomos localizados en la proteína E. El DIII de esta proteína es el blanco de muchos anticuerpos fuertemente neutralizantes, específicos para cada serotipo y con poca reactividad cruzada (Crill & Roehrig, 2001). La inmunización con una vacuna de ADN, codificante para el DIII de cada serotipo de dengue, indujo anticuerpos contra los cuatro serotipos y protegió parcialmente en un reto en ratones (Mota et al., 2005). Los anticuerpos dirigidos al loop de fusión, por otro lado, han sido fuertemente asociados al desarrollo de AMA (Dejnirattisai et al., 2016).

Al momento de iniciar este proyecto sólo existía una vacuna aprobada contra dengue: CYD-TDV, de nombre comercial Dengvaxia. Es una vacuna atenuada quimérica, donde se usó el genoma del virus de la fiebre amarilla, otro flavivirus, para insertar los genes de las proteínas prM y E de cada serotipo de dengue. Los cuatro virus quiméricos son mezclados para crear la vacuna tetravalente (Guy & Jackson, 2016). La eficacia de esta vacuna fue más baja de lo esperada, del 47 al 83%, dependiendo del serotipo (Hadinegoro et al., 2015). Además, la aplicación de la vacuna en niños de 2 a 8 años que nunca habían sido infectados con dengue, se asoció a un mayor riesgo de desarrollar dengue grave, por lo que no es posible su aplicación en este rango de edad (Sridhar et al., 2018). Una de las hipótesis para explicar este fenómeno, es que la vacuna actúa como una primera infección y que, posteriormente, cuando se presenta una infección real, se genera el fenómeno de AMA (Flasche et al., 2016). Otras vacunas contra dengue se encontraban en fase de evaluación clínica (Deng et al., 2020); y contemplan vacunas atenuadas, inactivadas, de subunidad, de ADN y vectores virales. Dos de ellas, DENVax y TV003/TV005, vacunas tetravalentes en fase III de evaluación clínica, han mostrado, en general, un mejor desempeño que la vacuna CYD-TDV; sin embargo, ningún estudio

clínico ha evaluado si con estas vacunas se pudiera presentar el efecto AMA con Zika (Sáez-Llorens et al., 2017; Whitehead et al., 2017). Recientemente (a seis años de iniciar este proyecto) se aprobó el uso de la vacuna DENVax (Takeda) en Indonesia, Europa y Brasil, con resultados muy prometedores (Biswal et al., 2020, 2019).

En el caso de Zika, aún no se dispone de ninguna vacuna, pero existen varios candidatos en fase de evaluación clínica. Éstos incluyen plataformas de ADN, mRNA, vectores virales y vacunas inactivadas (Diamond et al., 2019). De estos candidatos, sólo uno de ellos considera el efecto AMA. Una vacuna de mRNA contiene mutaciones en el loop de fusión de la proteína E, con lo cual eliminan la AMA en una infección posterior por dengue (Richner et al., 2017).

Otros candidatos en pruebas preclínicas buscan eliminar el efecto de AMA. Uno de ellos es una vacuna que usa el virus vaccinia Ankara modificado como vector de entrega del gen de la proteína no estructural NS1 de ZIKV. Esta vacuna mostró protección en un reto intracerebral con ZIKV en ratones (Brault et al., 2017); al ser una proteína no estructural, los anticuerpos contra esta proteína no causan AMA. López-Camacho et al., (2018) reportaron el uso de un vector de adenovirus para entregar el gen de la proteína prM; así como el gen de la proteína E sin la región transmembranal, las cuales indujeron anticuerpos que no presentan AMA con DENV2, según lo evaluado en un modelo celular.

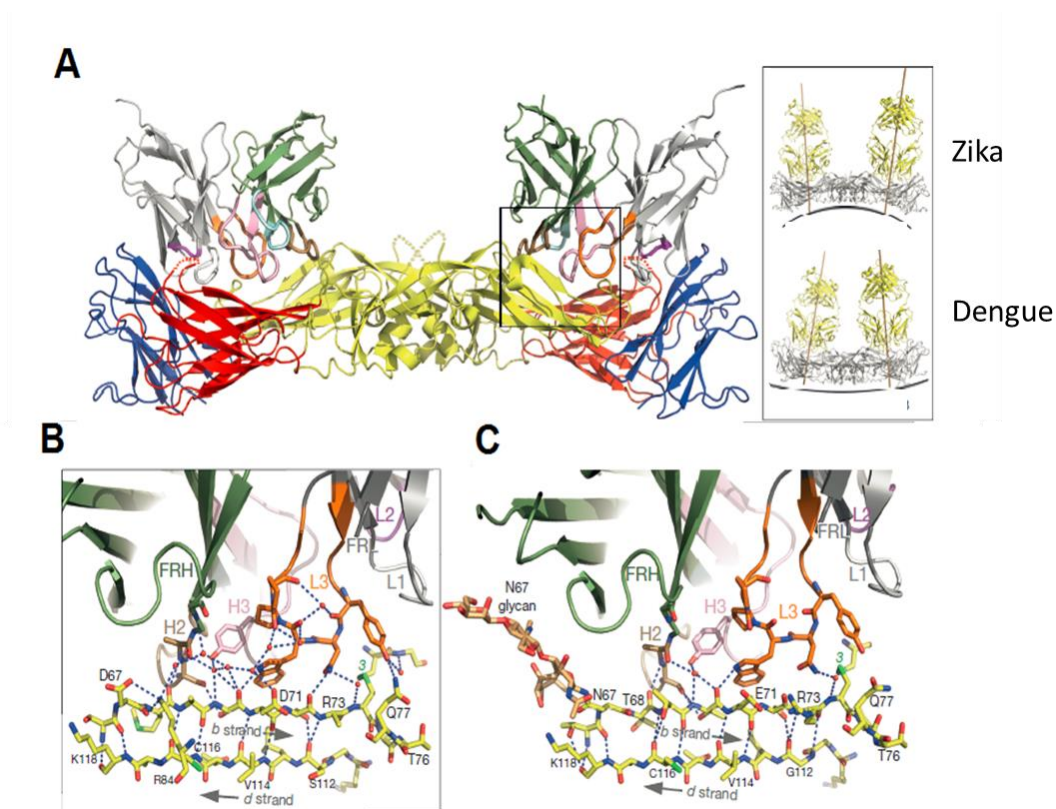
Finalmente, existen acercamientos en donde se busca generar una vacuna universal contra dengue y Zika. Se han aislado anticuerpos de pacientes convalecientes de dengue que son capaces de neutralizar los cuatro serotipos de dengue y Zika (Dejnirattisai et al., 2014; Swanstrom et al., 2016). Estos anticuerpos están dirigidos a un epítipo llamado EDE (envelope-dimer epitope), localizado en la interfaz de los dos monómeros de proteína E que forman el dímero en la superficie viral. En cultivo celular, los anticuerpos anti-EDE no mostraron AMA a las mismas concentraciones donde los anticuerpos anti-loop de fusión causaron amplificación; además, pudieron inhibir el efecto AMA de otros anticuerpos amplificadores (Dejnirattisai et al., 2016). En ratonas en gestación, estos anticuerpos controlaron la transmisión vertical de ZIKV (Fernandez et al., 2017); y en ratones nacidos con anticuerpos maternos contra Zika, estos anticuerpos previnieron la AMA cuando a las crías se les retó con DENV (Fowler et al., 2018). Resulta entonces muy interesante el uso de este epítipo como vacuna contra dengue y Zika. Un aspecto crítico para esto es conservar la estructura del EDE, la cual depende del dímero de proteína E. En este sentido, se ha tratado de estabilizar el dímero de la proteína E de dengue y de Zika, mediante la introducción de puentes disulfuro, los cuales además reducen la exposición del loop de fusión (Rouvinski et al., 2017; Slon Campos et al., 2017). La inmunización de ratones con los dímeros de proteína E de ZIKV indujo anticuerpos neutralizantes contra ZIKV, que

no presentaron reactividad cruzada con DENV ni causaron AMA. Se demostró que estos anticuerpos reconocen principalmente epítomos localizados en el dímero de la proteína; sin embargo, no se demostró que estuvieran dirigidos al EDE, ni fueron capaces de neutralizar DENV (Slon-Campos et al., 2019).

## 2.2 El epítomo EDE

El epítomo EDE (*Envelope Dimer Epitope*) fue reportado por primera vez en 2014 por Dejnirattisai y colaboradores; quienes caracterizaron 145 anticuerpos monoclonales de pacientes infectados con dengue, incluido el anticuerpo EDE1 C8, que posteriormente se identificaría como uno de los anticuerpos más neutralizantes contra DENV y ZIKV. Ellos identificaron que una fracción de los anticuerpos sólo reconocía al virus intacto en ELISA, mas no a la proteína E en inmunoblot. Además, mapearon el sitio de unión de estos anticuerpos a la interface del dímero de proteína E y clasificaron a los anticuerpos en dos grupos: aquellos cuya unión era sensible a la N-glicosilación presente en el residuo 153 de la proteína E de dengue (EDE2) y aquéllos cuya unión no se afectaba con la ausencia del glicano (EDE1). En el mismo estudio, mostraron que estos anticuerpos neutralizan los cuatro serotipos de dengue (Dejnirattisai et al., 2014). En 2015, Rouvinski et al. reportaron las estructuras cristalográficas de la proteína E de dengue 2 en complejo con los fragmentos de unión a antígeno de cuatro de estos anticuerpos neutralizantes de amplio espectro e identificaron los residuos que participan en la interacción con la proteína E de dengue. Finalmente, Barba-Spaeth y colaboradores (2016) reportaron que estos anticuerpos también neutralizan el virus Zika, obtuvieron las estructuras cristalográficas de fragmentos de cadena de sencilla de algunos de estos anticuerpos en complejo con la proteína E de dengue y Zika y reportaron los residuos que participan en la interacción con ambos virus. Mediante estos estudios se elucidó que los residuos clave para la interacción anticuerpo-epítomo, y que por lo tanto definen al epítomo EDE, están situados en la interfaz de los dos monómeros de proteína E. Así el epítomo EDE es un epítomo discontinuo, debido a que no puede ser definido por una secuencia sucesiva de aminoácidos. Según lo reportado por Barba-Spaeth et al. (2016), cada dímero de proteína E posee dos epítomos EDE y por lo tanto dos sitios de unión para los anticuerpos anti-EDE (figura 4A). Además, en ese estudio, los anticuerpos que reconocen el epítomo EDE se unieron en diferente ángulo al dímero de proteína E de dengue y Zika en solución (figura 4A, recuadro a la derecha) lo cual atribuyeron a que el dímero de proteína E de dengue es más propenso a deformar su estructura en solución comparado a cuando está en el virión, sin quedar claro si esto es relevante in vivo. Tomando como referencia la proteína E de dengue 2, el epítomo EDE incluye la lámina beta *b* (aminoácidos 67-74), el *loop* de fusión (aminoácidos 97-106) y residuos cercanos a la lámina beta *j* (aminoácidos 246-250) en un monómero (figura 4B y C). Los residuos que definen al EDE en el otro monómero del dímero de proteína E varían dependiendo del anticuerpo

estudiado. El anticuerpo EDE1 C8 une residuos de las láminas beta A y B (aminoácidos 309-311 y 323); mientras que el anticuerpo EDE2 A11 se une en el *loop* 150 y la hélice contigua  $\alpha 0$  (aminoácidos 152-158) (Barba-Spaeth et al., 2016). Los glicanos en la posición 67 de la proteína E de dengue interactúan con el anticuerpo EDE1 C8, mientras que su ausencia en la proteína E de Zika muestra que esto no es indispensable en la unión (comparar figura 4C y 4B).



**Figura 4. A) Unión del fragmento variable de cadena sencilla del anticuerpo EDE1 C8 al epítipo EDE de Zika. A la derecha se muestran los ángulos de unión de la fracción de unión a antígeno del anticuerpo EDE1 C8 (amarillo) a la proteína E (gris). B) Acercamiento de la región encuadrada en A para el virus Zika (B) y dengue (C). El fragmento variable de cadena sencilla del anticuerpo EDE1 C8 se muestra en gris, verde, rosa y naranja; el dímero de proteína E se muestra en rojo (dominio I), amarillo (dominio II) y azul (dominio III). La imagen fue tomada y modificada de Barba-Spaeth et al., (2016).**

Los aminoácidos clave en la interacción anticuerpo – epítipo EDE están conservados en ambos virus y se ha sugerido que el alto grado de identidad que presentan los virus en este sitio es debido a que esta región es el sitio de interacción con la proteína prM (Rouvinski et al., 2015). Esto explica por qué los anticuerpos dirigidos a este sitio son neutralizantes tanto del virus del dengue como del Zika y sugiere que la presentación aislada de este epítipo podría dar lugar a la generación de anticuerpos capaces de neutralizar ambos virus.

### 2.3 El anticuerpo EDE1 C8

El anticuerpo EDE1 C8 es un anticuerpo que reconoce específicamente el epítipo EDE, fue aislado de un paciente infectado con dengue y su secuencia fue reportada por Dejnirattisai et al. (2014). De un panel de seis anticuerpos específicos para el epítipo EDE, el anticuerpo EDE1 C8 mostró mayor afinidad y capacidad para neutralizar los cuatro serotipos de dengue y el virus del Zika que el resto de los anticuerpos evaluados (Barba-Spaeth y col. 2016). Las interacciones que determinan la unión entre este anticuerpo y la proteína E se han localizado en la lámina beta *b* del dominio II y en el *loop* de fusión (figura 4). Además, el anticuerpo interactúa con algunos residuos situados en el *loop* ij, en el *loop* 150 y en la interfaz del dímero; sin embargo, se ha reportado que estas interacciones no son determinantes para la unión (Rouvinski y col. 2015; Barba-Spaeth y col. 2016). Las interacciones entre el anticuerpo y la proteína son principalmente de tipo polar y de Van der Waals; y se dan entre los átomos de la cadena principal de la proteína y algunos residuos aromáticos distribuidos tanto en la cadena ligera como en la cadena pesada del anticuerpo (Rouvinski y col. 2015; Barba-Spaeth y col. 2016).

El glicano de la posición 67, exclusivo de la proteína E del virus del dengue, también participa en la interacción con el anticuerpo EDE1 C8 (figura 4C); como consecuencia, el anticuerpo se une en un ángulo distinto para el caso de la proteína E del virus del dengue (figura 4A, recuadro). Sin embargo, estas diferencias no afectan la unión ni la neutralización del virus, ya que el anticuerpo presenta afinidad y capacidad de neutralización similares tanto para el virus del dengue, como para el virus del Zika (Barba-Spaeth y col. 2016).

### 2.4 Mimótopos

Los mimótopos son péptidos, generalmente de entre 6 y 20 aminoácidos, que mimetizan la estructura de un epítipo y, por lo tanto, contienen los elementos estructurales mínimos requeridos para generar una respuesta inmunológica contra el epítipo original. Se ha demostrado que pueden ser usados para mimetizar epítipos discontinuos (Felici, Luzzago, Folgori, & Cortese, 1993; Luzzago, Felici, Tramontano, Pessi, & Cortese, 1993; Riemer & Jensen-Jarolim, 2007) y el principal enfoque en su estudio es su uso como vacunas.

La principal ventaja del uso de mimótopos como vacunas es que no se debe recurrir directamente al antígeno original, lo cual es necesario cuando el antígeno presenta características indeseables, como patogenicidad. El uso, por ejemplo, de alérgenos para combatir alergias, puede inducir una reacción anafiláctica. En el caso de polisacáridos de bacterias, éstos tienen propiedades inmunomodulatorias que dificultan su uso como vacuna. En el caso de la proteína E de dengue y Zika, como se ha descrito previamente, ésta presenta epítomos que pueden dar lugar a anticuerpos no neutralizantes y amplificadores de infecciones secundarias; es por ello que se planteó la obtención de un mimótopo del epítomo EDE, a fin de estudiar si es posible direccionar la respuesta inmune hacia la generación de anticuerpos neutralizantes de amplio espectro contra dengue y Zika, que no presenten AMA; esto como una estrategia de diseño racional de una vacuna contra estos virus.

Se han obtenido mimótopos de epítomos de virus como el de la hepatitis B y C (Delmastro, Meola, Monaci, Cortese, & Galfrè, 1997; Meola et al., 1995), del virus de la inmunodeficiencia humana (Humbert et al., 2007; Karpenko et al., 2012), del virus de la encefalitis japonesa (Wu & Lin, 2001), de la proteína NS4b del virus del dengue serotipo 3 (Amin et al., 2013); y de múltiples cepas de influenza A (Zhong et al., 2011), entre otros. Los mimótopos también se han usado para generar terapias contra alergias, al ser usados para inducir la formación de IgG que compitan por el sitio de unión de las IgE causantes de alergias (Ganglberger et al., 2000; Leung et al., 2017); así como para mimetizar epítomos no proteicos, como los lipopolisacáridos localizados en la superficie de *Mycobacterium tuberculosis* (Shin, Franco, Nair, Collins, & Shiloh, 2017). En todos los casos los péptidos compitieron con el antígeno natural por el sitio de unión a un anticuerpo, y fueron capaces de estimular la producción de anticuerpos contra el epítomo original; demostrando el potencial de los mimótopos como candidatos vacunales.

Otro enfoque consiste en obtener mimótopos capaces de emular epítomos de moléculas presentes en la superficie de células cancerosas, con el fin de estimular la respuesta inmune contra diferentes tipos de cáncer. En este caso se han usado, además de epítomos de células B, epítomos de células T, con el fin de estimular este tipo de respuesta inmune (Buhrman et al., 2013).

## 2.5 El virus adeno-asociado como acarreador de epítomos

El virus adeno-asociado (AAV), de la familia *Parvoviridae*, género *Dependovirus*, es un virus no envuelto que posee un genoma de ADN de cadena sencilla de 4.7 Kb. El genoma posee repeticiones terminales invertidas en cada extremo, indispensables en el proceso de replicación; así como dos genes, el gen *rep* y el gen *cap*, que dan lugar a las proteínas Rep y las proteínas VP, respectivamente.

Las proteínas Rep (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40) se generan a partir de dos mARN que pueden ser procesados para retirar un intrón o no. Éstas están implicadas en la replicación e integración del genoma, además de activar o inhibir la transcripción. Por su parte, las proteínas VP (VP1, VP2 y VP3) se obtienen a partir de un mRNA que es procesado de dos formas distintas para dar lugar al mARN codificante para VP1 o al mRNA codificante para VP2 y VP3, las cuales se producen usando diferentes codones de inicio. Otra proteína no estructural, denominada AAP, o proteína activadora de ensamblaje, se produce a partir de un segundo marco de lectura del gen *cap*.

Las cápsides del AAV, de alrededor de 20 nm, están formadas por 60 monómeros de las proteínas VP1, VP2 y VP3, en relación 1:1:10, que se ensamblan de forma icosaédrica con un número de triangulación de 1.

La replicación del AAV depende de la presencia de otros virus auxiliares, como los adenovirus, de tal forma que por sí sólo no es capaz de llevar a cabo una infección productiva. Tampoco se le ha asociado con el desarrollo de alguna enfermedad; es por ello que desde hace años se aprobó su uso comercial en dos fármacos para terapia génica (Wang, Tai, & Gao, 2019).

De acuerdo a lo anterior, la mayoría de los reportes sobre la aplicabilidad de este virus en Biotecnología han sido enfocados a la terapia génica. Numerosos estudios han modificado la cápside del AAV mediante la inserción de péptidos en su superficie, con el fin de cambiar el tropismo del virus y hacer la terapia génica tejido-específica. De estos estudios, la posición 587 y 588, respecto a la proteína VP1, ha sido la más utilizada para la inserción de péptidos, debido a que se ha demostrado que inserciones de hasta 34 aminoácidos en esta posición no tienen un efecto en el ensamblaje de las cápsides, y que esta posición está expuesta en la superficie del virus (Adachi & Nakai, 2010).

Más recientemente, se ha explorado el uso del AAV como acarreador de epítomos para su uso en vacunas. Debido a la repetitividad y estructuración de los epítomos presentados en su superficie, además de la inmunogenicidad intrínseca del AAV, se espera que éste sea capaz de estimular una buena respuesta de células B. Las cápsides usadas como acarreadoras de epítomos son partículas vacías, es decir, no contienen el genoma, por lo que se denominan partículas similares a virus, o virus-like particles (VLPs). Estas partículas han sido obtenidas mediante la co-expresión de las tres proteínas estructurales, o mediante la expresión de VP3 sola.

En un primer reporte, Nieto et al., (2012) desplegaron dos epítomos del virus del papiloma humano en VLPs del AAV y las usaron para inmunizar diferentes cepas de ratón. Obtuvieron altos títulos de anticuerpos neutralizantes contra diferentes tipos del virus, en ambas cepas; además, de forma importante, no observaron que la preinmunidad hacia el AAV tuviera un efecto negativo en la



respuesta hacia los epítomos. De hecho, algunos estudios han sugerido que los anticuerpos preexistentes pudieran jugar un papel importante, aumentando la internalización de las partículas de AAV por las células del sistema inmune (Manzano-Szalai et al., 2014; Nieto et al., 2012).

También se ha demostrado que al desplegar el antígeno en la superficie de un vector de AAV, se aumenta el título y la avidad de los anticuerpos obtenidos, comparado a cuando se usa sólo el vector con el transgen del antígeno (Rybniker et al., 2012). La respuesta de anticuerpos corresponde principalmente al tipo IgG1 (Manzano-Szalai et al., 2014; Singer et al., 2016) y se ha visto que puede perdurar hasta un año después de la inmunización en conejos (Jagu et al., 2015).

En uno de los trabajos más recientes, Singer et al., (2016) utilizaron VLPs de AAV para construir una librería de mimótopos desplegados en la superficie de las VLPs; y la utilizaron para encontrar mimótopos de HER-2, un receptor sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer. La inmunización con las cápsides que desplegaban los mimótopos indujo anticuerpos contra HER-2 y disminuyó el tamaño de los tumores formados en un modelo de ratón.

### III. HIPÓTESIS

Es posible obtener de un mimótopo del epítipo EDE de los virus dengue y Zika que, al aislar sus características estructurales e inmunológicas, pueda ser usado como candidato a vacuna.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1. Objetivo general

Diseñar un candidato a vacuna contra dengue y Zika basado en un mimótopo del epítipo EDE

#### 4.2. Objetivos específicos

1. Producir un anticuerpo dirigido al epítipo EDE.
2. Obtener un mimótopo del epítipo EDE.
3. Construir un sistema de despliegue del mimótopo que conserve sus características estructurales.
4. Caracterizar la estructura secundaria del mimótopo y su interacción con el anticuerpo EDE1 C8.
5. Evaluar la capacidad de los candidatos vacunales para inducir una respuesta de anticuerpos contra los virus dengue y Zika.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Producción y caracterización del anticuerpo EDE1 C8

#### 5.1.1. Generación de células CHO-S productoras del anticuerpo EDE1 C8

Las secuencias del fragmento de unión a antígeno (Fab) del anticuerpo EDE1 C8 fueron reportadas por Rouvinski et al. (2015). Dichas secuencias fueron fusionadas a la fracción cristalizable (Fc) de la IgG1 humana, para la expresión del anticuerpo completo. Adicionalmente, se añadieron secuencias de péptidos señal en el extremo 5' de la cadena ligera y pesada. La secuencia de aminoácidos y de nucleótidos de las cadenas pesada y ligera completas se muestra en el anexo 1. Las secuencias codificantes completas fueron sintetizadas y clonadas en el vector Freedom<sup>®</sup> pCHO1.0 por la compañía LakePharma. Este vector contiene dos sitios de clonación, cada uno con promotor y región de poliadenilación, para dirigir la expresión simultánea de dos proteínas. Además, contiene los genes de la enzima la N-acetil-transferasa de puromicina y la enzima dihidrofolato reductasa. La primera permite seleccionar aquellas células que han incorporado el plásmido a su genoma, usando puromicina; mientras que el segundo gen permite amplificar el número de copias del gen de interés: la cadena pesada y ligera; usando metotrexato, con el fin de aumentar la productividad. El plásmido contiene un gen de resistencia a kanamicina para su propagación en bacteria. La cadena pesada se clonó entre los sitios de corte de las enzimas AvrII y BstZ17I y la cadena ligera entre los sitios EcoRV y PacI del vector. El plásmido resultante se denominó pCHO-EDE1C8.

Se cultivaron células CHO-S en medio CD FortiCHO adicionado con glutamina 8 mM a 37°C, 130 rpm y 8% CO<sub>2</sub>. Se transfectaron 3x10<sup>7</sup> células, en 30 mL de cultivo, con 50 µg de pCHO-EDE1C8, usando el reactivo FreeStyle MAX. Adicionalmente, se transfectaron células con el plásmido pCHO-MPC2-EGFP como control de transfección. El plásmido se linealizó con la enzima PvuI antes de la transfección. 48 horas post transfección (h.p.t.), las células se dividieron a la mitad y se les realizó un cambio completo de medio. La mitad de ellas se cambió a medio CD FortiCHO adicionado con 10 µg/mL de puromicina y 100 nM de metotrexato; mientras que la otra mitad se cambió a medio con 20 µg/mL de puromicina y 200 nM de metotrexato (medios de selección). Se subcultivaron a una concentración de 5x10<sup>5</sup> células viables/mL en frascos T75 y se incubaron bajo las mismas condiciones sin agitación. Las células se monitorearon 7 y 10 días después, cuando la viabilidad superó el 30%; entonces se transfirieron a matraz agitado con medio de selección y antiaglomerante (Gibco, 0010057DG). Una vez que las células alcanzaron una viabilidad del 85% y densidad celular de 1x10<sup>6</sup> células viables/mL, se generaron bancos de trabajo. Para ello, las células se amplificaron y se resuspendieron a una concentración de 1x10<sup>7</sup> células viables/mL en medio CD

FortiCHO adicionado con 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido). Se hicieron alícuotas de 1 mL y se almacenaron en congelamiento en nitrógeno líquido. Los bancos celulares generados fueron denominados CHO-EDE1C8 10/100 y CHO-EDE1C8 20/200, según la concentración de agentes de selección utilizada.

#### 5.1.2. Producción y purificación del anticuerpo EDE1 C8

Las células CHO-EDE1C8 10/100 se sembraron a una concentración de  $3 \times 10^5$  células viables/mL en cultivos de 150 mL usando medio con o sin agentes de selección y antiaglomerante. El cultivo se incubó bajo las condiciones descritas y se suplementó con 4 g/L de glucosa los días 3, 5 y 7. Se monitoreó la concentración y viabilidad celular, mediante el método de exclusión en cámara de Neubauer utilizando azul de tripano; además, se tomaron muestras a lo largo del tiempo para cuantificar el anticuerpo EDE1 C8 mediante ELISA.

Los cultivos se cosecharon cuando la viabilidad cayó al 70%. Para la cosecha, el cultivo se centrifugó a 12,000 x g durante 5 min a 4°C y el sobrenadante se almacenó a 4°C hasta la purificación. El anticuerpo EDE1 C8 se purificó por cromatografía de afinidad a proteína A en una columna de 2 mL empacada con resina ProSep Ultra, utilizando en un equipo AKTAprime Plus. Se utilizó PBS (NaCl 0.3 M pH 7.6) como buffer de equilibrio y glicina 0.1 M pH 3 como buffer de elución. El anticuerpo puro se concentró y cambió a buffer HEPES (Ácido 4-(2-hidroxi-etil)piperazin-1-iletanosulfónico) 100 mM/ NaCl 100 mM/ acetato de sodio 50 mM pH 6, utilizando centricones con tamaño de corte de 30 kDa. La concentración del anticuerpo puro se determinó por espectrofotometría (NanoDrop1000). Para su almacenamiento, se añadió glicerol hasta una concentración del 40% y se almacenó a -20°C.

Para el ELISA, las placas se recubrieron con 100 µL/pozo de anticuerpo de captura (Southern Biotech 2042-01) a 2 µg/mL en PBS (NaCl 270 mM pH 7.6), o sólo con PBS durante toda la noche a 4°C. Los lavados se realizaron de la siguiente manera: tres veces con 300 µL/pozo de PBST (0.5% Tween 20). Se bloqueó con 300 µL/pozo gelatina 5 mg/mL en PBST durante 2 h a 37°C. Después, se añadieron 100 µL/pozo de las muestras diluidas con PBS, por duplicado, así como una curva estándar de EDE1 C8, blancos (sobrenadante diluido de células que no expresen anticuerpo) y controles negativos (pozos sin anticuerpo de captura, donde se añadió EDE1 C8 diluido). Se incubó 1 h a 37°C y se lavó de la forma descrita. Se añadieron 100 µL/pozo de anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina (Santa Cruz Biotechnology, sc-2454) diluido 1:2500 con PBS y se incubó 1 h a 37°C. La solución de revelado se preparó justo antes de usar de la siguiente manera: se mezclaron 10 mL de solución de dietanolamina (MgCl<sub>2</sub> 2 mM / NaN<sub>3</sub> 4.4 mM / dietanolamina 1% v/v pH 9) con 20 µL de p-nitrofenil fosfato 60 mg/mL. Se realizaron los lavados y se añadieron 100

$\mu\text{L}$ /pozo de solución de revelado. Se incubó 15 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , se añadieron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de NaOH 3 M y se leyó absorbancia a 405 nm. La concentración de EDE1 C8 se calculó por interpolación en la curva estándar.

Se determinaron los parámetros cinéticos de velocidad máxima específica de crecimiento ( $\mu_{\text{max}}$ ) y velocidad específica de producción (qP) de las células productoras del anticuerpo EDE1 C8 creciendo en medio con metotrexato y puromicina y en medio sin agentes de selección. La velocidad máxima específica de crecimiento se calculó ajustando los datos a la forma linealizada del modelo exponencial de crecimiento, donde  $t$  = tiempo y  $X$  = concentración celular. Se graficaron los datos correspondientes al crecimiento exponencial, donde  $\mu = \mu_{\text{max}}$ . Para el cálculo de qP se utilizó la ecuación 2, donde dP es la concentración de anticuerpo respecto al tiempo (dt).

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu(t - t_0) \quad \text{ecuación 1}$$

$$qP = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt} \quad \text{ecuación 2}$$

### 5.1.3. Western blot del anticuerpo EDE1 C8

La expresión del anticuerpo se corroboró por western blot. Las muestras del sobrenadante del cultivo celular se separaron en un gel de poliacrilamida al 10% y se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore, IPVH00010) mediante transferencia húmeda. Posteriormente, se bloqueó la membrana con leche descremada al 5% en PBS durante dos horas a T ambiente o toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los lavados se realizaron con PBST (0.1% Tween 20), tres veces, durante 5 minutos. Enseguida, se añadió el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, 109-035-003) diluido 1:10 000 con PBST y se incubó 1 h a T ambiente con agitación. Después de los lavados, se añadió el sustrato (Millipore, WBLUF0500) durante un minuto y se observó la quimioluminiscencia en un fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+.

### 5.1.4. Dot-blot

Se activó una membrana de PVDF en metanol durante 1 min y se sumergió en buffer de transferencia (glicina 14.4 g/L, Trizma base 3 g/L, metanol 20%) hasta su uso. Las muestras se cargaron a la membrana usando un equipo Bio-Dot (Bio-rad, 1706545) e inmediatamente después, se bloqueó la membrana sumergiéndola en leche descremada al 5% en PBS e incubándola toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  con agitación. Se realizaron tres lavados con PBST (0.1% Tween 20), se añadió el anticuerpo primario (EDE1 C8) a una concentración de 27 ng/mL en PBST y se incubó 1 h a T ambiente con agitación. Posteriormente, se lavó de la forma descrita y se incubó con el anticuerpo secundario

(Jackson ImmunoResearch, 109-035-003) diluído 1:10 000 en PBST durante 1 h a T ambiente con agitación. Después de lavar, se puso en contacto la membrana con el sustrato (Millipore, WBLUF0500) durante un minuto y se observó la quimioluminiscencia en un fotodocumentador ChemiDoc™ XRS+.

Para el análisis de muestras en condiciones desnaturalizantes, la muestra se llevó a una concentración final de 2% de SDS y se calentó a 98°C durante 5 min. Posteriormente, éstas se cargaron a la membrana según lo descrito.

## 5.2. Descubrimiento de mimótopos mediante despliegue en fagos

### 5.2.1 Rondas de selección o enriquecimiento

Se utilizó la librería comercial Ph.D.<sup>TM</sup>-12 Phage Display Peptide Library de New England Biolabs, que consta de péptidos de 12 aminoácidos fusionados a la proteína p3 del bacteriófago M13 por medio de un linker de glicinas. Las rondas de selección se llevaron a cabo en inmunotubos sensibilizados con 1 mL de solución de anticuerpo EDE1 C8 o estreptavidina (control) a 20 µg/mL en buffer de NaHCO<sub>3</sub> 100 mM pH 9.4. Se incubaron a 4°C durante toda la noche y posteriormente se lavaron cinco veces con buffer TBST (0.1% Tween 20) y cinco veces con buffer TBS. Se llenaron los inmunotubos con buffer de bloqueo (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 8.6 / BSA 5 mg/ml / NaN<sub>3</sub> 0.02%) y se dejó incubando 1.5 h a 4°C. Para el control con estreptavidina, se incluyeron 0.1 µg/mL de estreptavidina en la solución de bloqueo sólo en este paso, durante las tres rondas de selección. Posteriormente, se realizaron lavados según lo descrito previamente, se añadieron 10<sup>11</sup> unidades formadoras de placa (UFP) de la librería diluídas en 1 mL de TBST, se agitó ligeramente y se añadieron 500 µL de solución de bloqueo. Los tubos se incubaron durante 1 h a T ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavaron 15 veces con TBST y 15 veces con TBS y se añadió 1 mL de un cultivo de *E. coli* ER2738 creciendo en medio LB adicionado con 20 µg/mL de tetraciclina en fase logarítmica (D.O.<sub>600nm</sub> = 0.7-0.8). Los tubos se incubaron 30 min a 37°C sin agitación y posteriormente 30 min a 37°C y 200 rpm. Esto es lo que llamamos eluído. Transcurrido el tiempo de incubación, se guardaron 10 µL del eluído para titularse; y el resto se trasvasó a un matraz de 250 mL con 20 mL de cultivo de *E. coli* ER2738 en fase temprana logarítmica (D.O.<sub>600nm</sub> = 0.01-0.05) creciendo en el medio antes mencionado. El cultivo se incubó durante 4.5 h a 37°C y 200 rpm para amplificar el eluído.

Después de 4.5 h, el cultivo infectado con el eluído se centrifugó a 12, 000 x g y 4°C durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se centrifugó bajo las mismas condiciones. Se tomó el 80% de la parte superior del sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo, se añadió 1/6 del volumen de polietilenglicol 20% / NaCl 2.5 M y se dejó precipitando toda la noche a 4°C.

Posteriormente, se centrifugó a 12 000 x g y 4°C durante 15 min. Se descartó el sobrenadante, se centrifugó de nuevo bajo las mismas condiciones y se retiró el líquido remanente con una micropipeta. El precipitado se resuspendió en 1 mL de TBS y se centrifugó a 14 000 rpm y 4°C durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó de nuevo añadiendo 1/6 del volumen de polietilenglicol 20% / NaCl 2.5 M e incubando en hielo por 30 min. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 14 000 rpm y 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante, se centrifugó de nuevo y se retiró el líquido remanente con una micropipeta. El precipitado se resuspendió en 200 µL de TBS, se centrifugó bajo las mismas condiciones y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo. Este es el amplificado, el cual se mezcló 1:1 con glicerol 80% y se almacenó a -20°C. Todos los buffers y soluciones utilizadas fueron esterilizadas antes de su uso y se llevó a cabo todo el procedimiento bajo condiciones estériles.

El eluido y amplificado se titularon según el procedimiento descrito en la siguiente sección. El amplificado se utilizó como una nueva librería para llevar a cabo una segunda ronda de selección; y a su vez, el amplificado obtenido de la segunda ronda fue utilizado como librería para llevar a cabo la tercera ronda de selección. Durante la segunda y tercera ronda de selección se aumentó la concentración de Tween 20 en el TBST a 0.5% en todos los pasos. Se utilizó NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.4 / gelatina 5 mg/ml como solución bloqueadora para la segunda ronda y NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.4 / leche descremada 5 mg/mL para la tercera ronda.

Después de la tercera ronda de selección, se tituló el eluido y se procedió a amplificar clonas individuales. Se inició un cultivo de *E. coli* ER2728 en medio LB con tetraciclina 20 µg/mL y se dejó incubando a 37°C y 200 rpm toda la noche. Por la mañana, se diluyó el cultivo 1:100 con LB y se colocaron 150 µL de cultivo diluido por pozo en una placa de 96 pozos. Se seleccionaron 94 placas azules derivadas de la titulación del eluido de la tercera ronda y se depositó una placa por pozo. La placa se incubó a 37°C y 200 rpm durante 4.5 h. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm y 4°C durante 15 min. El sobrenadante se transfirió a una placa nueva y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Se transfirió el 80% del sobrenadante a una placa nueva, se añadieron 50 µL de glicerol 80% estéril por pozo y se almacenó a -20°C. Esta es la placa maestra.

### 5.2.2. Titulación del bacteriófago M13

Se prepararon diferentes diluciones de la muestra utilizando medio LB líquido y se utilizaron 10 µL de cada dilución para infectar 200 µL de *E. coli* ER2738 en fase de crecimiento media logarítmica ( $D.O_{600nm} \approx 0.5$ ), creciendo en medio LB adicionado con 20 µg/mL de tetraciclina. Se incubó por 5 minutos, posteriormente se transfirió cada cultivo infectado a tubos con 3 mL de top agar a 45°C, se agitó vigorosamente y la mezcla se vertió en placas de medio LB con 50 µg/mL de

IPTG y 40 µg/mL de Xgal. Las placas se agitaron para distribuir el inóculo de forma homogénea por toda la superficie y se incubaron a 37°C durante 16 horas. Se contó el número de placas azules formadas y se calcularon las unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/mL) utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{UFP}{mL} = \frac{N^{\circ} \text{ de placas} \times \text{factor de dilución}}{\text{Vol. de inóculo en la infección (mL)}} \quad \text{ecuación 3}$$

### 5.2.3. ELISA para selección de clonas

Se llenó una placa para ELISA (Costar, High -Binding) de la siguiente manera: en la primer columna se colocaron 100 µL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.4, en la segunda columna se colocaron 100 µL de anticuerpo o estreptavidina 20 µg/mL diluídos en NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.4, en la tercer columna se colocaron de nuevo 100 µL de NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.4 y en la cuarta columna se colocaron 100 µL de anticuerpo o estreptavidina. Se llenó toda la placa de esa forma, alternando entre sólo buffer y buffer con anticuerpo o estreptavidina. Además, en un pozo se añadieron 1x10<sup>9</sup> UFP de la librería de fagos diluída en NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 9.4, en vez de anticuerpo o estreptavidina, como control positivo. Se incubó la placa a 4°C durante toda la noche. El mismo día se inició un cultivo de *E. coli* ER2728 en LB con tetraciclina 20 µg/mL y se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm.

El día siguiente, se diluyó el cultivo 1:100 con LB y se colocaron 210 µL del cultivo diluído por pozo en 47 pozos de placas para cultivo celular estériles, dejando un pozo vacío entre un pozo con cultivo y otro. Se inoculó el cultivo con 10 µL de cada clona por pozo, utilizando las clonas de la placa maestra, y se incubó la placa inoculada a 37°C y 200 rpm durante 4 h, posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm y 4°C durante 20 min. La placa cubierta con anticuerpo o estreptavidina se lavó tres veces con TBST (Tween 20 0.5%) y tres veces con TBS. Se añadieron 300 µL de buffer de bloqueo (NaHCO<sub>3</sub> 0.1 M pH 8.6 / BSA 5 mg/mL / NaN<sub>3</sub> 0.02%) por pozo, se incubó la placa a 37°C durante 2 h y, posteriormente, se lavó tres veces con TBST y tres veces con TBS. Se colocaron 90 µL de sobrenadante de la placa inoculada por pozo, colocando sobrenadante de la misma clona en dos pozos contiguos, de tal forma que para cada clona se tuvo un pozo control (sin anticuerpo ni estreptavidina) y otro pozo con target (anticuerpo o estreptavidina). La placa se incubó 1.5 h a 37°C y después se lavó de la forma antes mencionada. Se añadieron 100 µL de anticuerpo por pozo. Se utilizó un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa (GE, 27942101) diluído 1:2000 con buffer de bloqueo. La placa se incubó a 37°C durante 1 h. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó según



lo mencionado anteriormente y se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de solución reveladora (o-fenilendiamina 0.4 mg/mL /  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.012% en buffer de fosfato de sodio 0.1 M pH 5) recién preparada por pozo. Se incubó la placa a T ambiente protegida de la luz durante 10 min o hasta la aparición de color. La reacción se detuvo con 100  $\mu\text{L}$ /pozo de HCl 3 M y se determinó la absorbancia a 492 nm utilizando un lector de microplacas. Para cada clona, se determinó el porcentaje de absorbancia respecto al control, utilizando la siguiente fórmula:

$$\% Abs = \frac{Abs}{Abs\ control} \times 100 \quad \text{ecuación 4}$$

#### 5.2.4. Secuenciación de las clonas seleccionadas

Se purificó el ADN de las clonas seleccionadas para secuenciar. Se inició un cultivo de *E. coli* ER2728 en LB con tetraciclina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó toda la noche a 37°C y 200 rpm. El día posterior, se diluyó el cultivo 1:100 con LB y se colocaron 2 mL del cultivo diluido en tubos, un tubo por cada clona. Se inoculó cada tubo con 5  $\mu\text{L}$  de cada clona seleccionada, proveniente de la placa maestra, y se incubaron a 37°C y 200 rpm durante 4.5 h.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo se centrifugó a 14 000 rpm a T ambiente durante 30 seg. Se tomó 1 mL del sobrenadante en un tubo limpio y se mezcló con 400  $\mu\text{L}$  de polietilenglicol 20% / NaCl 2.5 M, se agitó por inversión y se incubó 15 min a T ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugó a 14 000 rpm y 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante, se centrifugó de nuevo y se retiró el sobrenadante con una micropipeta. El pellet se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de yoduro de sodio 4M / Tris HCl 10 mM / EDTA 1 mM, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se dejó incubando a T ambiente durante 15 min. Posteriormente, se centrifugó a 14 000 rpm y 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500  $\mu\text{L}$  de etanol al 70% a -20°C. Se centrifugó bajo las mismas condiciones, se descartó el sobrenadante y se secó el pellet aplicando vacío en un equipo Savant. El ADN se resuspendió en 30  $\mu\text{L}$  de buffer TE estéril, se cuantificó por espectrofotometría (NanoDrop1000) y se almacenó a -20°C.

El ADN de las clonas seleccionadas se mandó secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT, utilizando el oligonucleótido -96 gIII con secuencia 5'CCC TCA TAG TTA GCG TAA CG3'. Este primer hibrida 96 bases río abajo del sitio de inserción del péptido.

### 5.2.5. Alineamientos de las secuencias

Los alineamientos se realizaron en el servidor del EMBL-EBI, usando el programa MUSCLE, con secuencias previamente reportadas para la proteína E de ZIKV (UniProtKB: A0A024B7W1) y DENV2 (UniProtKB: A0A0B4SHY9).

## 5.3 Trabajando con péptidos

### 5.3.1. Dicroísmo circular

Los péptidos fueron producidos por síntesis química con una pureza mayor al 98% por la compañía GenScript. Para el análisis por dicroísmo circular, los péptidos se resuspendieron en Tris 10 mM pH 7.5/  $\beta$ -mercaptoetanol 5 mM a una concentración de 1 mg/mL y posteriormente se diluyeron 1:3 con el mismo buffer para dar una concentración final de 0.3 mg/mL. Se filtraron a través de un filtro de 0.45  $\mu$ m y se degasificaron mediante vacío y agitación. Los espectros de dicroísmo circular se registraron con un espectropolarímetro marca Jasco Modelo 715 (Analytical Instruments), usando una celda de 0.1 cm de longitud de paso óptico y midiendo en el intervalo de 190 a 260 nm. Los espectros se registraron cada 1 nm con un tiempo de promedio de la señal de 8 s por punto y con un ancho de banda de 1 nm. Los espectros finales se obtuvieron como resultado del promedio de tres determinaciones y se analizaron utilizando dos programas diferentes disponibles en la web: Bestsel y Dichroweb.

### 5.3.2. ELISA de los péptidos libres

En una placa de 96 pozos, se cubrieron pozos con distintas concentraciones (0.1 mg/mL, 1 mg/mL y 10 mg/mL) de los tres péptidos a evaluar, resuspendidos en buffer TBS, por triplicado. Para el control negativo se sensibilizó sólo con TBS. Se usaron 100  $\mu$ L/pozo y la placa se incubó a 4°C toda la noche. Se realizaron lavados de la siguiente manera: dos veces con 300  $\mu$ L/ pozo de TBST (0.1% Tween 20) y dos veces con TBS. Se bloqueó con 300  $\mu$ L/pozo de gelatina 5 g/L en TBS y se incubó 2 h a 37°C. Después de lavar, se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de anticuerpo EDE1 C8 5  $\mu$ g/mL en TBS y se incubó 1.5 h a 37°C. Posteriormente, se lavó y se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, sc-2454) diluído 1:2500 en TBS. La placa se incubó a 37°C durante 1 h, se lavó de la forma descrita y se añadieron 100  $\mu$ L/pozo de solución reveladora (p-nitrofenil fosfato 120  $\mu$ g/mL / dietanolamina 1% / MgCl<sub>2</sub> 50 mg/mL) preparada al momento. Posteriormente, se incubó a 37°C durante 30 min, se detuvo la reacción con 100  $\mu$ L/pozo de NaOH 3M y se leyó absorbancia a 405 nm.

### 5.3.3. Conjugación química de los mimótopos a proteínas acarreadoras

Se probó la conjugación química con N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC), en presencia o ausencia de N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS); así como conjugación con glutaraldehído. Primero se usó buffer MES (Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico) 50 mM/ NaCl 150 mM pH 5.5 para disolver el sulfo-NHS, la EDC y los péptidos a conjugar. Se utilizó buffer HEPES 100 mM/ NaCl 150 mM pH 7.2 como buffer de reacción de VP6 y BSA. Se usaron albúmina bovina (BSA) y nanotubos de VP6 de rotavirus como proteínas acarreadoras. BSA se adquirió en su forma comercial y VP6 se produjo y purificó por técnicas previamente reportadas por nuestro laboratorio (Plascencia-Villa et al., 2011). Para la reacción de activación del péptido se mezclaron 100  $\mu$ L del péptido a 10 mg/mL, con 11.6  $\mu$ L de la solución de EDC 110 mg/mL y 135  $\mu$ L de solución de sulfo-NHS 2 mg/mL; a fin de tener una relación molar de 1:10 de péptido:EDC y una concentración 5 mM de sulfo-NHS. Se incubaron las reacciones de activación 15 min a T ambiente. Posteriormente, se añadió 1 mL de BSA 745  $\mu$ g/mL o 1.4 mL de VP6 240  $\mu$ g/mL, según la disponibilidad de cada proteína, y se incubaron las reacciones 2 h a T ambiente.

En un segundo ensayo, se cambió el buffer de activación a MES 100 mM / NaCl 500 mM pH 6; y el buffer de las proteínas acarreadoras y de reacción a HEPES 100 mM / NaCl 150 mM pH 8. Para la reacción de activación se mezclaron 250  $\mu$ L de BSA 10 mg/mL con 250  $\mu$ L de EDC 288  $\mu$ g/mL y 11.5  $\mu$ L de sulfo-NHS 50 mg/mL. Se incubó 15 min a T ambiente, posteriormente se añadió 1 mL de BSA 10 mg/mL y las reacciones de conjugación se incubaron toda la noche a 4°C con 350 rpm de agitación.

Finalmente, la mejor condición para la conjugación con EDC sola fue usar buffer MES 100 mM pH 5; y para las reacciones donde se añadió NHS fue usar buffer de boratos 100 mM pH 8.8. Se disolvieron el péptido, la proteína acarreadora, la EDC y el NHS en buffer de boratos. Se mezclaron 100  $\mu$ L de péptido 10 mg/mL con 100  $\mu$ L de BSA 10 mg/mL y 200  $\mu$ L de EDC 2.9 mg/mL. La mezcla se incubó 2 h a T ambiente y se añadió NHS a una concentración final de 10 mg/mL. Se incubó 2 h a T ambiente y después se almacenó a 4°C. Para las reacciones en presencia de TCEP, se les añadió 1  $\mu$ L de TCEP·HCl 1 M a los 200  $\mu$ L de péptido 10 mg/mL en boratos, se incubó 5 min a T ambiente y se procedió a la conjugación, pero en esta ocasión se utilizó una concentración de EDC de 10 mg/mL en la reacción. Las reacciones secuenciales se llevaron a cabo mezclando 100  $\mu$ L de péptido 10 mg/mL en buffer MES 100 mM pH 5 con 1  $\mu$ L de TCEP·HCl 1 M, se incubó 5 min a T ambiente, se añadió EDC y NHS en buffer MES a una concentración final de 40 mg/mL cada uno, se incubó 15 min a T ambiente, se añadieron 300  $\mu$ L de BSA 3.3 mg/mL en buffer de boratos, se incubó 2 h a T ambiente y se almacenó a 4°C.

Para la estandarización de conjugaciones con glutaraldehído, se preparó BSA 0.5 mg/mL en PBS. Se prepararon diferentes concentraciones de glutaraldehído en agua, partiendo de glutaraldehído al 70% grado I. 500 µL de BSA se mezclaron con 250 µL de la solución de glutaraldehído, añadido gota a gota. Las reacciones se incubaron a 25°C o 4°C a 450 rpm durante diferentes tiempos. La reacción se detuvo añadiendo 75 µL de buffer Tris-glicina 5X. Para las reacciones de conjugación con péptido, se preparó la mezcla de proteína acarreadora con el exceso molar del péptido, en buffer MES, PBS o HEPES en 250 µL. Se añadieron 125 µL de la solución de glutaraldehído en agitación a 25°C y se incubó toda la noche a 4°C y 450 rpm. La reacción se detuvo añadiendo 15 µL de Tris-Glicina 5X.

#### 5.3.4. Análisis de los conjugados por HPLC fase reversa

Se utilizó una columna Symmetry C18 de 4.6x75 mm en un equipo Waters con un detector de absorbancia dual 2487. Se utilizó ácido trifluoroacético 0.065% en agua (fase A) y ácido trifluoroacético 0.05% en acetonitrilo (fase B) como fases móviles y se monitoreó la absorbancia a 220 y 214 nm. Los productos de la reacción de conjugación se eluyeron bajo el siguiente esquema:

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	0.3	95	5
75	0.3	35	65
75.03	0.3	5	95
93	0.3	5	95
93.03	0.3	95	5
120	0.3	95	5

#### 5.4 Trabajando con los virus dengue y Zika

##### 5.4.1. Propagación e inactivación de los virus dengue y Zika

Los virus dengue y Zika fueron donados por la Dra. Victoria Pando (Instituto Nacional de Salud Pública) y la Dra. Susana López (Instituto de Biotecnología UNAM), respectivamente. El virus dengue corresponde al serotipo 2 aislado de un paciente infectado, mientras que el virus Zika corresponde a la cepa MR766 linaje africano.

Los virus dengue y Zika fueron propagados en células C6/36 en medio EMEM/5% SFB. Las células se infectaron a una multiplicidad de infección (M.O.I.) de 0.1 UFP/cel en ausencia de SFB

durante una hora. Posteriormente, se añadió más medio sin SFB y las células se incubaron durante 5 días en el caso de Zika y 7 días en el caso de dengue.

Los virus se cosecharon sometiendo las células a tres ciclos de congelado/descongelado, posteriormente se centrifugaron a 5,000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana estéril de 0.2  $\mu\text{M}$  y se alicuotó para su almacenamiento a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Para la inactivación de los virus, se colocaron 500  $\mu\text{L}$ /pozo en placas de 6 pozos. La placa se colocó dentro de la campana de flujo laminar en una posición de aproximadamente  $45^{\circ}$  de frente a la lámpara de luz UV. Los virus se irradiaron durante 30 minutos en intervalos de 10 minutos. La solución de virus se mezcló con una micropipeta cada 10 minutos antes de proceder al siguiente ciclo. La inactivación se corroboró mediante titulación por ensayo de formación de focos; y la integridad de la estructura del virus se confirmó mediante dot blot con el anticuerpo EDE1 C8.

#### 5.4.2 Titulación de los virus dengue y Zika

Se sembraron células Vero en medio DMEM (10% SFB) en placas de 96 pozos a una densidad de 62,000 células/ pozo. El día siguiente, se removió el medio de las células por inversión de la placa y las células fueron infectadas con 50  $\mu\text{L}$ /pozo de diluciones seriadas del virus en medio DMEM. Se incubaron 2 horas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 8% de  $\text{CO}_2$  y, posteriormente, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de medio DMEM por pozo. La placa se incubó 40 h y se procedió a la tinción.

Se retiró el medio por inversión de la placa, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de metanol frío por pozo y se incubó 15 minutos. Se realizaron dos lavados con 100  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS y se bloqueó con 100  $\mu\text{L}$ /pozo de gelatina 5 g/L en PBS y se incubó 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron dos lavados con 100  $\mu\text{L}$ /pozo de PBST (0.1%) y un lavado con 100  $\mu\text{L}$ / pozo de PBS. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$ /pozo del anticuerpo primario (GeneTex, GTX133314 dilución 1:1000 para Zika y Abcam, ab9202 dilución 1:1000 para dengue) en PBS con 1% leche, y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Se realizaron tres lavados de la forma descrita y se añadieron 50  $\mu\text{L}$ /pozo del anticuerpo secundario (Santa Cruz Biotechnology, sc-2004 dilución 1:2000) en PBS con 1% de leche. Se incubó 1 h a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados según lo descrito. Se añadieron 50  $\mu\text{L}$ /pozo de sustrato (Life Technologies, 002019) y se incubó la placa 20 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . La reacción se detuvo haciendo tres lavados con PBS y se añadieron 100  $\mu\text{L}$ /pozo de PBS para visualizar al microscopio. El número de unidades formadoras de focos (UFF) se contó al microscopio. Para obtener el número de UFF/mL, se dividió el número de focos contados entre el volumen de infección (0.05 mL) y se multiplicó por la dilución.

## 5.5 Sistema de despliegue en el virus adeno-asociado

### 5.5.1. Amplificación y clonación del gen Cap del AAV2

Se sembraron  $1 \times 10^6$  células viables SF9/ pozo en una placa de 6 pozos. Cuando las células alcanzaron confluencia (24 horas después), se infectaron con el baculovirus recombinante Bac-CapAAV2, que posee el gen Cap del virus adeno-asociado serotipo 2 (AAV2). Se desconocía el título, por lo que se infectó utilizando 100 o 200  $\mu\text{L}$ /pozo. Las células de los pozos infectados con 200  $\mu\text{L}$  se despegaron y cosecharon 72 horas post infección (h.p.i), mientras que las infectadas con 100  $\mu\text{L}$ /pozo, se cosecharon 96 h.p.i. Se extrajo el genoma del baculovirus utilizando el kit Easy DNA (Invitrogen K1800-01), a partir el sobrenadante de las células infectadas. La secuencia del gen Cap del AAV2 se amplificó a partir del genoma del baculovirus mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos FwAAV2CAP\_ACG y RevAAV2CAP (Tabla 2), y la polimerasa de ADN de alta fidelidad Phusion (NEB, M0530S) bajo condiciones estándares de reacción. El producto de PCR se visualizó por electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 0.8%, y se purificó utilizando el Kit Monarch DNA gel extraction (NEB, T1020L). El gen Cap se ligó con el vector pJET1.2/Blunt (ThermoFisher Scientific, K1231), utilizando la ligasa de ADN T4 (ThermoFisher Scientific, K1231) bajo condiciones estándares de reacción, dando lugar al plásmido que denominamos pJET-CapAAV2. El producto de la ligación se utilizó para transformar células quimiocompetentes *E. coli* TOP10 y las células transformadas se seleccionaron en placas de LB con 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ampicilina. El plásmido pJET-CapAAV2 se extrajo utilizando el kit Zyppy Plasmid Miniprep (Zymo Research, D4020), y se corroboró la clonación del gen Cap mediante reacciones de digestión con las enzimas EcoRI (NEB, R3101S) y XbaI (NEB, R0145S) y posterior visualización de los fragmentos, mediante electroforesis de ADN en geles de agarosa al 0.8%. Adicionalmente, se corroboró la secuencia del gen Cap por secuenciación utilizando los oligonucleótidos Fw\_pJET1.2, Rev\_pJET1.2 y Fw\_sequencing (Tabla 2).

### 5.5.2. Modificación del gen Cap con los sitios NotI y SgfI

Con el fin de introducir los sitios de corte de las enzimas de restricción NotI y SgfI entre las posiciones 1775 y 1776 del gen Cap, se diseñaron los oligonucleótidos divergentes Fw\_NotSgf\_AAV2 y Rv\_Not\_AAV2, que hibridan en dichas posiciones. Además de la secuencia de hibridación, el oligonucleótido Fw contiene las secuencias de corte de las enzimas de restricción NotI y SgfI, en ese orden, en el extremo 5'; mientras que el oligonucleótido Rv contiene la secuencia de corte de la enzima NotI en el extremo 5'. Se amplificó todo el plásmido pJET-CapAAV2 por PCR utilizando dichos oligonucleótidos. El producto de la amplificación se cambió de buffer usando el kit DNA Clean and Concentrator (Zymo Research, D4003). Posteriormente se fosfató y ligó en una

reacción, usando las enzimas quinasa de polinucleótido T4 (NEB, M0201S) y la ligasa T4 (NEB, M0202S) bajo condiciones estándares de reacción. El producto de la ligación se purificó con el siguiente protocolo: se añadió un volumen de cloroformo, se mezcló bien y se centrifugó a 10 000 rpm por 3 min a temperatura ambiente; la fase superior se transfirió a un tubo nuevo y se concentró aplicando vacío en un equipo Savant. Se transformaron células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes con el producto purificado y las células transformadas se seleccionaron en placas con 100 µg/mL de ampicilina. Se seleccionaron varias colonias y se crecieron en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina. Se extrajeron los plásmidos utilizando el kit descrito previamente y se sometieron a digestión con la enzima NotI (NEB, R0189S) a fin de corroborar la inserción del sitio de restricción. Los fragmentos se separaron y visualizaron mediante electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 0.8%, a fin de seleccionar una colonia. Para la colonia seleccionada, se corroboró la secuencia del gen Cap con los sitios NotI y SgfI mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos Fw\_pJET1.2, Rev\_pJET1.2 y Fw\_sequencing. El plásmido resultante se denominó pJET-Cap\_NotSgf.

El gen Cap con los sitios NotI y SgfI se subclonó en el plásmido pFastBac1. Para ello, el plásmido pJET-Cap\_NotSgf y el plásmido pFastBac1 se digirieron con las enzimas NotI y SgfI para liberar los fragmentos correspondientes al gen Cap y al vector pFastBac1. Ambos se purificaron utilizando el kit Monarch DNA gel extraction (NEB, T1020L). Los fragmentos se ligaron usando la ligasa T4 (NEB, M0202S) bajo condiciones estándares de reacción. El producto de la ligación se purificó según el protocolo ya descrito y se usó para tansformar células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Las células transformadas se seleccionaron en placas de LB con 7 µg/mL de gentamicina. Se seleccionaron varias colonias y se crecieron en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina. Se extrajeron los plásmidos utilizando el kit descrito previamente y se sometieron a digestión con las enzimas EcoRI (NEB, R3101S) y XbaI (NEB, R0145S) a fin de corroborar la ligación de los fragmentos. Los fragmentos de la digestión se separaron y visualizaron mediante electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 0.8%, a fin de seleccionar una colonia. Para la colonia seleccionada, se corroboró la secuencia del gen Cap con los sitios NotI y SgfI mediante secuenciación utilizando los oligonucleótidos Fw\_pFast, Rv\_pFast y Fw\_sequencing. El plásmido resultante se denominó pFast-CapAAV2-NotSgf.

### 5.5.3. Clonación de las secuencias codificantes de los mimótopos

La secuencia nucleotídica de los mimótopos (M1, M2 y M3), flanqueada por la secuencia codificante de un espaciador de tres glicinas y tres alanina en cada extremo del mimótopo, fue sintetizada por la compañía IDT. Dicha secuencia contiene los sitios de restricción de las enzimas

NotI y SgfI en el extremo 5' y 3', respectivamente, a fin de ser insertados en cualquier sistema de despliegue de péptidos, utilizando los sitios mencionados.

La secuencia de los mimótopos, así como el plásmido pFast-CapAAV2-NotSgf fueron digeridos con las enzimas NotI (NEB, R0189S) y SgfI (Promega, R7103). Adicionalmente, el plásmido pFast-CapAAV2-NotSgf se digirió sólo con la enzima NotI. La secuencia de los mimótopos digerida se separó por electroforesis de ADN en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 3%; mientras que para el plásmido digerido se usó un gel de agarosa normal al 0.8%. La purificación de los fragmentos, su ligación y purificación de la ligación se realizó según lo ya descrito. Cada secuencia de mimótopo se ligó con el plásmido digerido pFast-CapAAV2-NotSgf; mientras que el plásmido digerido sólo con NotI se ligó consigo mismo para dar lugar a un plásmido que contiene el gen Cap con inserción de una secuencia codificante para un espaciador de cinco alaninas y dos isoleucinas, para expresar las cápsides que fungirán como control negativo. El producto de la ligación se usó para transformar células de *E. coli* TOP10 quimiocompetentes. Las colonias transformadas se seleccionaron en placas de LB con 100 µg/mL de ampicilina, se seleccionaron varias colonias y se crecieron en medio LB con 100 µg/mL de ampicilina. Los plásmidos se extrajeron según lo descrito previamente y se verificó la secuencia e inserción de los mimótopos usando los oligonucleótidos Fw\_pFast, Rv\_pFast y Fw\_sequencing. De esta forma, se obtuvieron cuatro plásmidos donadores: pFast-Cap-M1, pFast-Cap-M2, pFast-Cap-M3 y pFast-Cap-Linker (control).

#### 5.5.4. Obtención de b́acmidos recombinantes

Se utilizó el sistema Bac-to-Bac de Invitrogen. Brevemente, los plásmidos donadores se usaron para transformar células *E. coli* DH10Bac quimiocompetentes. Las células transformadas se seleccionaron en placas de LB con 50 µg/mL de kanamicina, 10 µg/mL de tetraciclina y 7 µg/mL de gentamicina; además de 50 µL/placa de IPTG 50 µg/mL/Xgal 40 µg/mL distribuidos en la superficie. Se seleccionaron las colonias blancas y se analizaron por PCR de colonia. Se usaron los oligonucleótidos Fw\_M13 y Rv\_M13 y la polimerasa de ADN Taq (NEB, M0273S) bajo condiciones estándares de reacción. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis de ADN en un gel de agarosa al 2%. De esta forma se obtuvieron las colonias con los b́acmidos recombinantes.

Los b́acmidos recombinantes se purificaron según el siguiente protocolo, usando las soluciones del kit para extracción de plásmido 12163 de Qiagen. Todo el procedimiento se llevó a cabo en condiciones de esterilidad. Se inocularon 3 mL de LB adicionado con 50 µg/mL de kanamicina, 10 µg/mL de tetraciclina y 7 µg/mL de gentamicina, con una colonia de cada b́acmido. Los cultivos se incubaron a 37°C y 300 rpm durante 24 horas. Se transfirieron 2 mL de cultivo a un tubo y se centrifugaron a 14 000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. El pellet celular se



resuspendió en 300  $\mu$ L de solución P1, se añadieron 300  $\mu$ L de solución P2 y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se añadieron, lentamente y mezclando, 300  $\mu$ L de solución P3 y se colocó la muestra 5 min en hielo. Los tubos se centrifugaron a 14 000 rpm y 4°C durante 10 min. El sobrenadante se vertió en otro tubo con 800  $\mu$ L de isopropanol, se agitó por inversión y se incubó toda la noche a -20°C. La mezcla se centrifugó a 14 000 rpm y 4°C durante 15 min, se removió el sobrenadante, se añadieron 500  $\mu$ L de etanol al 70%, se invirtió el tubo varias veces para lavar el pellet y se centrifugó durante 10 min bajo las mismas condiciones. Se repitió el lavado, se retiró el sobrenadante y se secó el pellet a T ambiente durante 10 min. El pellet se resuspendió en 100  $\mu$ L de agua y se tomó una alícuota para cuantificarse por espectrofotometría (NanoDrop1000). El resto se almacenó a 4°C hasta la transfección.

**Tabla 2. Nombre y secuencia de los oligonucleótidos utilizados**

Nombre	Secuencia 5'-3'
FwAAV2CAP_ACG	GAA TTC CTG TTA AGA CGG CTG CCG ACG GTT ATC TAC CCG ATT GGC TC
RevAAV2CAP	TCT AGA TTA CAG ATT ACG AGT CAG GTA TCT GGT GCC AAT G
Fw_NotSgf_AAV2	ACT TGT GCG GCC GCA ATT GCG ATC GCA AGA CAA GCA GCT ACC GCA GAT GTC
Rv_Not_AAV2	ACT TGT GCG GCC GCG TTG CCT CTC TGG AGG TTG GTA GAT ACA G
Fw_pJET1.2	CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC
Rev_pJET1.2	AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG
Fw_sequencing	CCT CTG GTC TGG GAA CTA ATA CGA TG
Fw_pFast	GTA GGT ATC GAT ACA TGG AGA TAA TTA AAA TGA TAA CCA
Rv_pFast	TAA TCG TTC TAG AGA TCC AGA CAT GAT AAG ATA C
Fw_M13	CCC AGT ACA GAC GTT GTA AAA CG
Rv_M13	AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GG

#### 5.5.5. Transfección de células SF9

Las células SF9 se mantuvieron en medio SF-900II SFM (Gibco, 10902088) a 27°C y 110 rpm. Para la transfección, se diluyeron a  $1 \times 10^6$  células viables/mL con medio Grace, se sembraron 2 mL/pozo en placas de 6 pozos y se dejaron adherir durante 30 min. Se mezclaron 1  $\mu$ g de bÁcrido, en un volumen de 50  $\mu$ L, con 20  $\mu$ L de FlyFectin (Invitrogen) y se le añadió 1 mL de medio Grace. La mezcla se incubó 20 min a T ambiente. Las células se lavaron con 2 mL de medio Grace por pozo y se les añadió la mezcla de ADN. Al control negativo se le añadió 1 mL de medio Grace. Se incubaron 4 h a T ambiente con agitación protegidas de la luz y, posteriormente, se les añadió 2

mL/pozo de medio SF-900II SFM para incubarse a 27°C. Se cosechó el sobrenadante 96 h post transfección y se añadieron 3 mL/pozo de medio SF900II SFM nuevo. Se cosechó de nuevo el sobrenadante y el pellet 3 días después. Se analizó la expresión de las proteínas del AAV mediante Western blot.

Una vez corroborada la expresión de las proteínas del AAV, se procedió a expandir los baculovirus recombinantes. Se infectaron 30 mL de células SF9 a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células viables/mL, con 300  $\mu$ L del sobrenadante obtenido 7 días post transfección. Se monitoreó la viabilidad y concentración celular. Cuando la viabilidad cayó al 10%, se cosechó centrifugando a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante (stock viral) se almacenó con 1% de SFB a 4°C protegido de la luz y se utilizó para realizar el ensayo en placa.

#### 5.5.6. Ensayo en placa

Se realizó un ensayo en placa para seleccionar una clona productora de cada baculovirus. Las células SF9 se diluyeron a  $1 \times 10^6$  células viables/mL con medio Grace's, se sembraron 2 mL/pozo en placas de 6 pozos y se dejaron adherir durante 30 min. Se realizaron diluciones seriadas del stock viral, en volúmenes de 1 mL, con medio Grace. Las células se lavaron con 2 mL de medio Grace's por pozo y se infectó con 1 mL/pozo de cada dilución, usando las diluciones desde  $10^{-2}$  hasta  $10^{-6}$ . Al control negativo se le añadió 1 mL de medio Grace's. Se incubaron 4 h a T ambiente con agitación protegidas de la luz y, posteriormente, se les retiró el inóculo y se les añadió 3 mL/pozo de medio Grace's adicionado con suero fetal bovino 10% y agarosa 2%, precalentado a 40 °C. Se esperó a que solidificara el medio y se incubaron a 27°C durante 96 h. Transcurrido ese tiempo, se añadió 2 mL/pozo de agarosa 0.6% adicionada con rojo neutro (0.02%), a 40°C, y se dejó solidificar. Las células se almacenaron a 4°C hasta el día siguiente, cuando se inspeccionaron al microscopio y a contraluz a fin de identificar halos de lisis celular (placas líticas). Se seleccionaron 5 placas líticas aisladas de cada baculovirus, en la dilución más conveniente. Se succionó cada una de las placas seleccionadas, se depositó en 0.9 mL de medio Grace's y se agitó vigorosamente. Las células SF9 se diluyeron a  $1 \times 10^6$  células viables/mL con medio SF-900II SFM, se sembraron 2 mL/pozo en placas de 6 pozos y se dejaron adherir durante 30 min. Se infectó cada pozo con una placa lítica diferente. Las células se incubaron 4 h a T ambiente con agitación, protegidas de la luz y, posteriormente, se añadieron 2 mL/pozo de medio SF-900II SFM. Se incubaron a 27°C durante 96 h, se retiró el sobrenadante y se almacenó con 1% de SFB a 4°C protegido de la luz (pase cero). Se procedió a analizar la expresión de las proteínas del AAV por western blot, en sobrenadante y pellet, a fin de seleccionar la placa mejor productora.

Una vez que se analizaron las diferentes placas, se seleccionó una de ellas y se amplificó para obtener el pase 1 del baculovirus. Para ello, se infectaron 30 mL de células SF9 a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células viables/mL, con 300  $\mu$ L del pase cero. Se monitoreó la viabilidad y concentración celular. Cuando la viabilidad cayó al 10%, se cosechó centrifugando a 3000 rpm durante 15 min. El sobrenadante se almacenó con 1% de SFB a 4°C protegido de la luz y se procedió a su titulación. Para la obtención del pase 2, o banco de trabajo, se infectaron 50 mL de células SF9 a una concentración de  $1.5 \times 10^6$  células viables/mL a una M.O.I. de 0.1 utilizando el pase 1. El baculovirus se cosechó, almacenó y tituló según lo descrito.

#### 5.5.7. Titulación de los baculovirus

Se diluyeron las células SF9 a  $0.18 \times 10^6$  células viables/mL con medio SF-900II SFM y se sembraron 50  $\mu$ L/pozo en placas de 96 pozos. Se utilizaron dos placas por cada baculovirus. Se realizaron diluciones seriadas de cada baculovirus ( $10^0$ - $10^{-10}$ ), utilizando el mismo medio, en un volumen de 1 mL. Las células se infectaron con 10  $\mu$ L/pozo de cada dilución, infectando dos columnas (16 pozos) con cada dilución. El mismo número de pozos se usó como control negativo y se dejó sin infectar. Se incubaron las células durante 6 días a 27°C.

Se añadieron 10  $\mu$ L/pozo de MTT (3-(4,5 dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromuro) 5 mg/mL y se incubaron 2 h a T ambiente con agitación protegidas de la luz. Las placas se centrifugaron 10 min a 2000 rpm, se aspiró el sobrenadante y se añadieron 50  $\mu$ L/pozo de DMSO. Las placas se incubaron con agitación 3 min y se leyó absorbancia a 570 nm.

Para el cálculo del título viral, se determinó el promedio de absorbancia y la desviación estándar de cada dilución. Los datos se ajustaron a un modelo sigmoide logístico de cuatro parámetros:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left( \frac{X}{X_0} \right)^b} \quad \text{ecuación 5}$$

El ajuste devuelve los valores de los parámetros a, b,  $X_0$ ,  $Y_0$  y el valor de correlación.  $X_0$ , es el valor de la dilución a la cual se observa el 50% de la respuesta a la infección viral.

El valor de  $X_0$  se sustituyó en la ecuación 6 con valor negativo, se obtuvo el inverso del logaritmo y se dividió entre el volumen de virus empleado en cada dilución (0.01 mL) para obtener el valor de la dosis media letal en cultivo celular (TCLD<sub>50</sub>/mL). Este valor se sustituyó en la ecuación 7 para obtener la dosis media infectiva en cultivo celular (TCID<sub>50</sub>/mL). Finalmente, para obtener el

valor de unidades formadoras de placa por mililitro (ufp/mL), se sustituyó TCID<sub>50</sub>/mL en la ecuación 8.

$$\frac{TCLD_{50}}{mL} = \frac{1}{\frac{10^{X0}}{0.01 mL}} \quad \text{ecuación 6}$$

$$\frac{TCID_{50}}{mL} = 10^{(0.912(\log_{10} \frac{TCLD_{50}}{mL}) + 1.674)} \quad \text{ecuación 7}$$

$$\frac{ufp}{mL} = 0.69 \left( \frac{TCID_{50}}{mL} \right) \quad \text{ecuación 8}$$

### 5.5.8. Producción y purificación de VLPs de AAV

Se crecieron células SF9 en medio PSFM. Se infectaron de 1.5 a 2x10<sup>6</sup> cel viables/mL en un volumen total de 250 mL, con los baculovirus recombinantes a una M.O.I. de 5. El cultivo se cosechó cuando la viabilidad celular cayó entre 65 y 60% (alrededor de 27 h.p.i.) para las cápsides con el mimótoto 2 (Cap-M2), o alrededor de 10% de viabilidad (cerca de 40 h.p.i.) para las cápsides con el mimótoto 3 y linker (Cap-M3 y Cap-Linker). Para ello, el cultivo se centrifugó a 3,000 rpm durante 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El pellet celular se congeló a -70°C hasta su procesamiento.

El pellet celular se resuspendió en 1 mL de buffer de lisis (Tris base 50 mM y MgCl<sub>2</sub> 2 mM pH 7.5) por cada 1x10<sup>7</sup> células, adicionado con 50 unidades de benzonasa por cada mL de buffer. Las células resuspendidas se incubaron en agitación 30 min a T ambiente, se añadió MgSO<sub>4</sub> hasta una concentración final de 37.5 mM y se incubó de nuevo en agitación 30 min a T ambiente. Después, se sometieron a 3 ciclos de congelamiento/descongelamiento, usando hielo seco y un baño de agua a 37°C. Se centrifugó a 3,000 x g por 15 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se filtró por una membrana estéril de acetato de celulosa de 0.45 µm. Esto es lo que llamamos clarificado. Se hicieron alícuotas del clarificado y se almacenaron a -70°C hasta su purificación.

Las cápsides se purificaron por ultracentrifugación en un gradiente de yodixanol formado por concentraciones de 15, 25, 40 y 60% en proporción 3:2:1.6:1, respectivamente. Se aplicó el clarificado al gradiente y se centrifugó a 27,000 rpm durante 6 h y 6 min a 7°C. Se recuperaron las fracciones y se analizaron por SDS-PAGE y Western blot.

Las fracciones donde se encontraban enriquecidas las proteínas del AAV se juntaron, se eliminó el yodixanol, se concentraron y se cambió el buffer a PBS, usando centricones de 50 kDa de corte.

#### 5.5.9. Protocolo modificado para extracción de Cap-M1

El pellet celular se trató según lo descrito en la sección anterior, hasta la incubación con  $MgSO_4$ . Posteriormente, para el protocolo 1, se añadió la cantidad necesaria de deoxicolato de sodio para tener una concentración de 5 mg/mL y se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación. Para el protocolo 2, el pellet se sometió a tres ciclos de congelado y descongelado, se añadió la cantidad necesaria de deoxicolato de sodio para obtener una concentración de 5 mg/mL y se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación. Para el protocolo 3, el pellet se sonicó dando tres pulsos de 5 s a una amplitud de 50% con descansos de 55 s, posteriormente, se añadió la cantidad necesaria de deoxicolato de sodio para obtener una concentración de 5 mg/mL y se incubó 1 h a temperatura ambiente con agitación.

Se centrifugó a 3000 g durante 15 min a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se filtró usando una membrana de 0.45  $\mu m$ . El pellet se resuspendió en PBS. Las fracciones se analizaron por Western blot.

#### 5.5.10. Western blot de las proteínas estructurales del AAV

Para confirmar la expresión de las proteínas estructurales del virus adeno-asociado, las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturizantes reductoras. Se realizó una transferencia húmeda a membranas de PVDF. La membrana se bloqueó con leche al 5% en TBST (0.05% Tween 20) durante 2 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4°C. Los lavados se hicieron tres veces, durante 5 min, con TBST. Se detectaron las proteínas utilizando el anticuerpo B1 (Fitzgerald, 10R-A114A) 1:5000 en TBST durante una hora a T ambiente, se realizaron los lavados de la forma descrita y se añadió el anticuerpo secundario anti-mouse-HRP (Santa Cruz Biotechnology, sc-2005) 1:5000 en TBST. Se incubó 1 h a T ambiente, se lavó la membrana y se añadió el sustrato (Merck, WBLUF0500) durante 1 min. La reacción se visualizó en un equipo ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad).

#### 5.5.11. Microscopía electrónica de transmisión

Las VLPs puras se diluyeron a 20  $\mu g/mL$  con PBS y se aplicó la muestra en rejillas de cobre recubiertas con Formvar-carbon (Electron Microscopy Sciences, CF200-Cu). La rejilla se colocó de 1 a 3 min en contacto con la muestra y se retiró el exceso de la rejilla usando papel filtro. Posteriormente, la rejilla se puso en contacto con acetato de uranilo 2% durante 15 s, se retiró el exceso con papel filtro y se analizaron de inmediato en un microscopio Zeiss Libra 120 a 70 kV en la Unidad de Microscopía Electrónica, IBT, UNAM.

### 5.5.12. Criomicroscopía electrónica

Las VLPs se produjeron de acuerdo a la sección 5.5.8 y se enviaron al New York Structural Biology Center. La preparación de la muestra, colección de imágenes y análisis de datos se llevó a cabo por nuestros colaboradores en dicho centro de investigación. Ver Cuevas-Juárez et al. (2023) para más detalles.

## 5.6. Experimentos con animales

### 5.6.1. Inmunización con fagopéptidos y mimótopos libres

El experimento fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (Proyecto 350). Se usaron 5 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad por grupo. La primera inmunización se realizó con los fagopéptidos, un fago WT (control negativo) o virus Zika inactivado (control positivo). La cantidad de fagos se determinó en base a la cantidad de epítomos EDE que inmunizamos en el virus inactivado, para tener una relación 1:1 de epítomos en ambos casos. El refuerzo se realizó con los péptidos libres, buffer TBS (control negativo) o virus Zika inactivado (control positivo). En cada caso, los inmunógenos se mezclaron 1:1 con adyuvante incompleto de Freund (AIF) en un volumen total de 50  $\mu$ L, antes de su aplicación por vía subcutánea. Durante la tercera inmunización, se usaron de nuevo los fagopéptidos pero en este caso no se utilizó adyuvante. Se tomaron muestras de sangre de la cola de los animales 14 días después de cada inmunización. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min para separar el suero; el cual se almacenó a -20°C hasta su análisis.

Tabla 1. Esquema de inmunización con fagopéptidos y mimótopos libres.

Grupo	1ª inmunización (día 1)	2ª inmunización (día 21)	3ª inmunización (día 42)
1	Fago WT + AIF	TBS + AIF	Fago WT
2	ZIKV inactivado + AIF	ZIKV inactivado + AIF	ZIKV inactivado
3	Fago-M2 + AIF	125 $\mu$ g M2 + AIF	Fago-M2
4	Fago-M3 + AIF	125 $\mu$ g M3 + AIF	Fago-M3
5	Fago-M1 + AIF	125 $\mu$ g M1 + AIF	Fago-M1

### 5.6.2. Determinación de anticuerpos anti-Zika, anti-M13 y anti-mimótopos por ELISA

Las placas de ELISA se sensibilizaron con 50  $\mu$ L/ pozo de virus Zika ( $5.4 \times 10^6$  FFU/mL). El control negativo se cubrió con PBS-T (0.1% Tween 20). Las placas se incubaron toda la noche a 4°C en una bolsa con papel húmedo sellada. Se realizaron 3 lavados con 300  $\mu$ L/pozo de PBS-T. Se

bloqueó con 300 µL/pozo de gelatina 5 g/L en PBS-T durante 2 h a 37°C. Se lavó de la forma descrita y se añadieron 50 µL/pozo de los sueros a diferentes diluciones, por duplicado, y se incubó a 37 °C durante 1 h. Se realizaron los lavados y se añadieron 50 µL/pozo del anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa (Jackson ImmunoResearch 115-035-003) diluído 1:1000 con PBS-T, y se incubó durante 1 h a 37°C. Después de lavar, se añadieron 50 µL/pozo de sustrato TMB para ELISA (Life Technologies 2023) y se incubó a 37°C durante 25 min. La reacción se detuvo añadiendo 50 µL/pozo de HCl 0.5 M y se leyó absorbancia a 450 nm.

Para la determinación de anticuerpos anti-M13, la placa se sensibilizó con 50 µL/pozo del bacteriófago M13 en TBS ( $1 \times 10^{12}$  CFU/mL). Para la determinación de anticuerpos anti-mimótopos, la placa se sensibilizó con 50 µL de una solución del péptido sintético 1 mg/mL en TBS. El resto del procedimiento se siguió de acuerdo a lo descrito para la determinación de anticuerpos anti- ZIKV.

### 5.6.3. Inmunizaciones con las VLPs modificadas

El experimento fue aprobado por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología (Proyecto 386). Se usaron 5 ratones BALB/c hembras de 6 a 8 semanas de edad por grupo. Los ratones se inmunizaron con 25 µg de VLPs puras en 25 µL de PBS y mezcladas en relación 1:1 en volumen con adyuvante, hasta un volumen final de 50 µL/ratón. Se usó adyuvante incompleto de Freund para la primera inmunización y alúmina para la tercera, sin añadir adyuvante a la segunda y cuarta dosis. Se realizaron en total cuatro inmunizaciones en intervalos de dos semanas. La primer y segunda dosis se realizaron por vía subcutánea; y las últimas dos inmunizaciones por vía intramuscular.

Una semana antes de la primera inmunización se tomó la muestra de sangre preinmune. Se tomó una primera muestra inmune una semana después de la segunda inmunización y una segunda muestra inmune una semana después de la última inmunización. Todas las muestras se tomaron de la vena de la cola. Las muestras se centrifugaron a 3000 rpm y 4°C durante 15 min. Se recolectó el suero y se almacenó a -70°C.

La detección de anticuerpos anti-Zika y anti-dengue se realizó mediante ELISA, según lo descrito previamente.

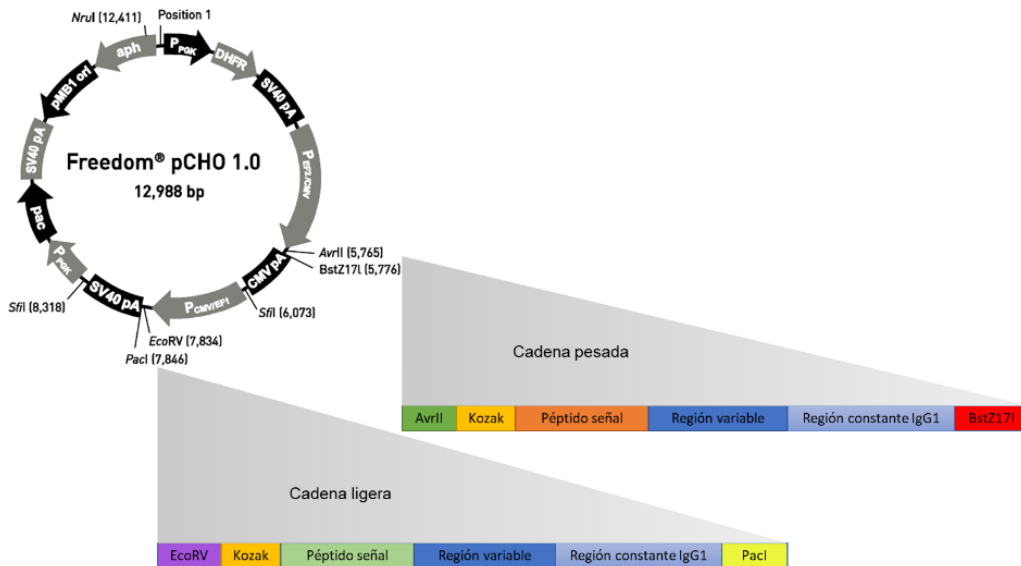
## VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Producción del anticuerpo EDE1 C8

El anticuerpo EDE1 C8 es una IgG1 aislada de un paciente infectado con dengue; y la secuencia de las cadenas que forman el Fab fue reportada por Rouvinski et al. (2015). Este anticuerpo dirigido al epítipo EDE es fuertemente neutralizante para todos los serotipos de dengue y Zika, con concentraciones inhibitorias del 50% de la infección ( $FRNT_{50}$ ) en el rango de 0.015-1.13 nM; mientras que otros anticuerpos contra dengue y Zika mostraron un  $FRNT_{50}$  en el rango de 0.08-102 nM en el mismo estudio (Barba-Spaeth et al., 2016). Este anticuerpo, además, mostró una constante de afinidad (Kd) de 9 nM por el dímero de proteína E de Zika; mientras que otro anticuerpo neutralizante de dengue y Zika mostró una Kd de 840 nM por la misma proteína (Barba-Spaeth et al., 2016). Debido a esto, decidimos emplearlo para encontrar un mimótopo del epítipo EDE, buscando un péptido capaz de unirse a este anticuerpo. Para ello, generamos una estrategia a fin de producirlo en el laboratorio.

Las secuencias de la región variable de la cadena ligera y pesada se fusionaron a las secuencias de las regiones constantes de la IgG1 humana. Se añadió un péptido señal a cada cadena, basándonos en lo reportado por Haryadi et al. (2015), quienes reportaron secuencias consenso de péptidos señales encontrados en anticuerpos humanos. Además, se añadieron los elementos necesarios para la traducción de los genes en mamífero, como la secuencia Kozak y los codones de inicio y de paro (Figura 5). La secuencia completa de los genes codificantes para cada cadena, así como la secuencia final de la proteína, se presenta en el anexo I. Estas secuencias codificantes se clonaron en el vector Freedom pCHO1.0.

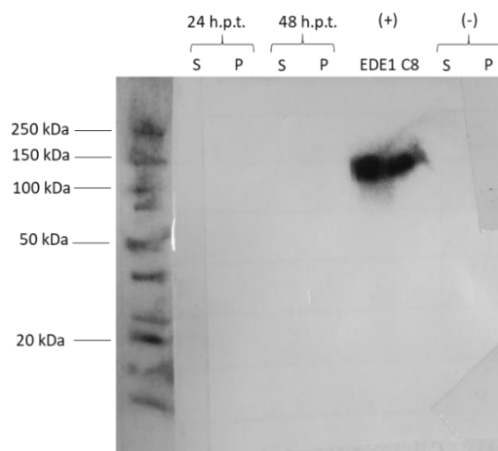




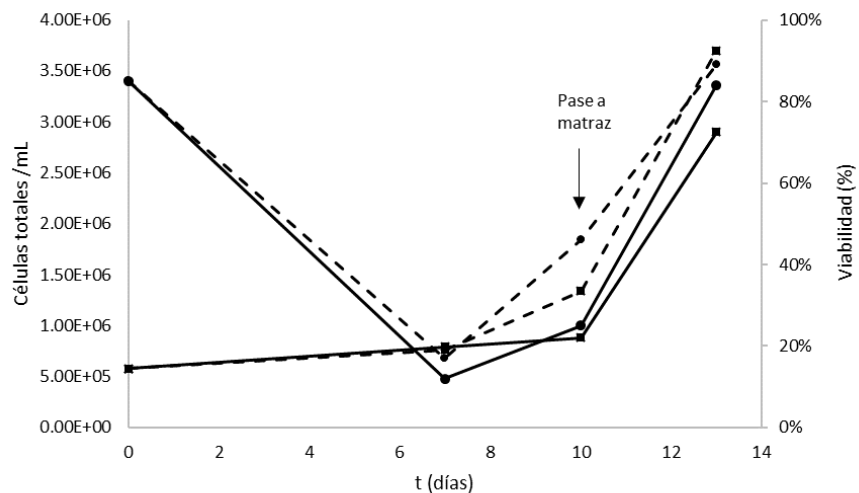
**Figura 5. Diseño de la construcción para expresión del anticuerpo EDE1 C8 en células CHO. La secuencia codificante de la cadena pesada se insertó entre los sitios AvrII y BstZI7 yLa secuencia codificante de la cadena ligera se insertó entre los sitios EcoRV y PacI.**

No se observó expresión del anticuerpo 24 ni 48 horas post transfección (h.p.t.) en células CHO (figura 6) probablemente debido a la baja eficiencia de transfección (13%), según lo observado con un plásmido control que expresa EGFP. Debido a esto, decidimos seleccionar sólo aquellas células que habían incorporado el plásmido mediante su cultivo en medio con los agentes de selección metotrexato y puromicina. Se emplearon dos combinaciones de estos agentes: 10 µg/mL de puromicina y 100 nM de metotrexato; así como 20 µg/mL de puromicina y 200 nM de metotrexato. Siete días después de pasar las células transfectadas a medio con agentes de selección, podemos observar una disminución drástica en la viabilidad, además de que no hay un aumento en la concentración celular (figura 7) debido a que todas las células que no incorporaron el plásmido mueren. Alrededor de 10 días después del inicio de la selección, las células mostraron recuperación, manifestada como un aumento tanto en la viabilidad como en el conteo celular, por lo que se pasaron de condiciones estáticas a un matraz agitado. En el día 13 después del inicio de la selección, las células alcanzaron una viabilidad mayor al 80% y concentración celular de alrededor de  $3 \times 10^6$  células/ mL, concluyendo la fase de selección. En este punto, se pudo alcanzar el 100% de células expresando EGFP en el control, lo que nos dice que la selección fue exitosa. Las células generadas se denominaron CHO-EDE1C8 10/100 y CHO-EDE1C8 20/200, según la concentración de agentes de selección utilizada. El sobrenadante y pellet de los cultivos de la fase de selección se analizó por

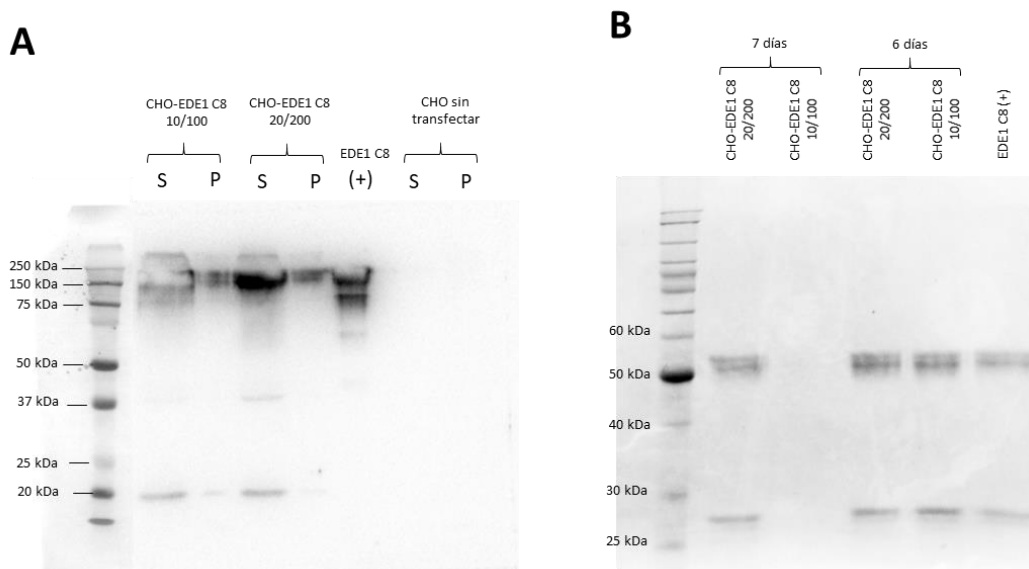
Western blot y se pudo observar la expresión del anticuerpo EDE1 C8 (figura 7), principalmente localizado en la fracción extracelular de ambos cultivos. Se hicieron bancos de trabajo de las células seleccionadas.



**Figura 6.** Western blot en condiciones no reductoras de las células transfectadas con el plásmido pCHO-EDE1C8. S= Sobrenadante, P= Pellet.



**Figura 7.** Concentración (■) y viabilidad (●) celular de las células CHO-EDE1C8 durante el proceso de selección con puromicina 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y metotrexato 100 nM (- -) o con puromicina 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y metotrexato 200 nM (—).



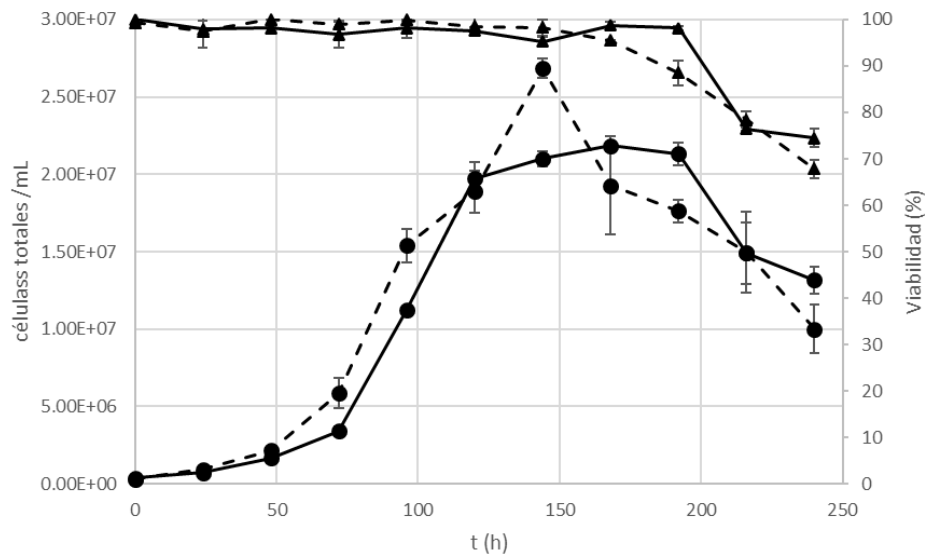
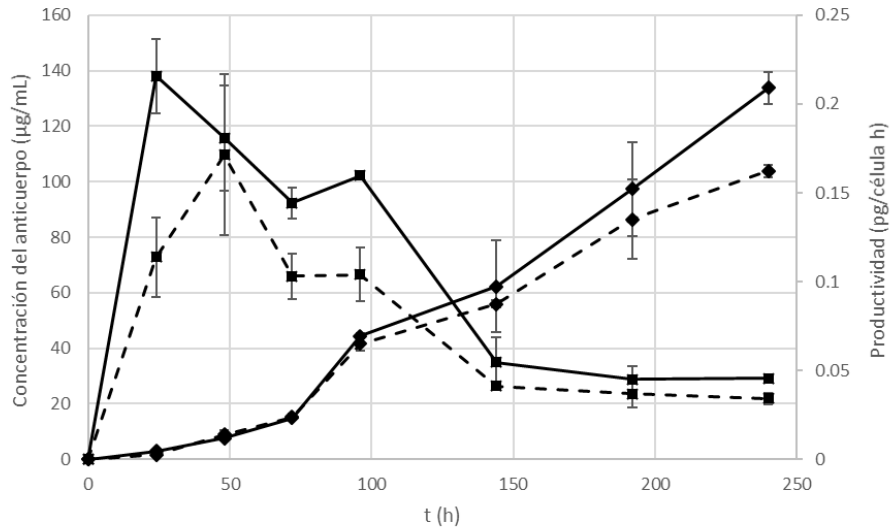
**Figura 8.** A) Western blot en condiciones no reductoras de las células productoras del anticuerpo EDE1 C8. S= Sobrenadante, P= Pellet. B) SDS-PAGE en condiciones reductoras del anticuerpo EDE1 C8 puro, producido por los dos bancos celulares y a diferentes tiempos de cosecha.

Se llevaron a cabo cultivos en lote de cada tipo de células, cosechando a 6 o 7 días de cultivo. El anticuerpo se purificó del sobrenadante y no se observó diferencia en la cantidad ni calidad del anticuerpo recuperado entre las células obtenidas con las diferentes concentraciones de agentes de selección (figura 8B); por lo que en adelante se decidió trabajar con las células CHO-EDE1C8 10/100. En este experimento no fue posible recuperar anticuerpo del cultivo de las células CHO-EDE1C8 10/100 al día 7, ya que se perdió durante la concentración con centricones, después de la purificación.

Posteriormente, llevamos a cabo cultivos en lote alimentado, a fin de aumentar la producción del anticuerpo. Además, se realizaron cultivos en presencia y ausencia de los agentes de selección en el medio, a fin de determinar la estabilidad en la expresión del anticuerpo al retirar los agentes de selección. La presencia de metotrexato y puromicina no afectó la viabilidad de las células; sin embargo, los cultivos creciendo en medio sin agentes de selección mostraron mayor velocidad máxima de crecimiento ( $\mu_{\max} = 0.04 \text{ h}^{-1} \pm 0.002$  sin agentes y  $0.03 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$  con agentes), y alcanzaron mayor concentración celular (figura 9A). La productividad de las células creciendo en

medio con metotrexato y puromicina fue mayor; así como la concentración de anticuerpo a lo largo de la cinética (figura 9B); lo cual significa que la no adición de los agentes de selección tiene un impacto negativo en la producción del anticuerpo. Se ha reportado que los genes amplificados mediante el sistema de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), como el empleado aquí, pueden perderse por segregación o rearrreglos genéticos en ausencia del agente de selección metotrexato (Kim & Lee, 1999); lo cual causa que la expresión del gen de interés decaiga a lo largo de los pases celulares. En nuestro caso, observamos una disminución en la expresión del anticuerpo en tiempos tan cortos como 10 días de cinética. Por otro lado, con este sistema la integración al genoma de los genes de interés se hace en una unidad de integración, junto con el gen de la enzima DHFR. La presencia de metotrexato puede favorecer la transcripción y traducción del gen de la DHFR. Al estar situados en lugares cercanos en el genoma, la transcripción del gen de la DHFR podría favorecer la transcripción de los genes de interés, lo cual explicaría porqué en presencia de metotrexato se favorece la producción de anticuerpo. Por lo tanto, para la producción posterior de otros lotes de anticuerpo, se decidió mantener los cultivos con metotrexato y puromicina, a fin de maximizar la productividad.

Estas células fueron sometidas sólo a una fase de selección, mientras que, para este sistema, el proveedor recomienda una segunda fase de selección aumentando la concentración de metotrexato, a fin de amplificar de nuevo el número de copias del gen de interés en el genoma. Esto seguido de una selección clonal por dilución limitante para encontrar las mejores clonas productoras. Es necesario avanzar a las siguientes etapas de selección para optimizar la producción estable del anticuerpo, aunque la cantidad de anticuerpo obtenida fue suficiente para este proyecto.

**A****B**

**Figura 9. Cinética de producción del anticuerpo EDE1 C8 en presencia (—) y ausencia (- -) de agentes de selección. A) Datos de concentración (●) y viabilidad celular (▲). B) Productividad (■) y concentración (◆) del anticuerpo EDE1 C8 a lo largo de la cinética.**

## 6.2. Descubrimiento de mimótopos mediante despliegue en fagos

Para el descubrimiento de mimótopos se utilizó una librería de péptidos de 12 aminoácidos desplegados en la superficie del bacteriófago M13 unidos a la proteína pIII mediante un espaciador de tres glicinas. Existen otras librerías de péptidos disponibles, como la de péptidos de 7 aminoácidos y la de péptidos circulares, que utilizan también al fago M13. Sin embargo, se decidió utilizar la de 12 aminoácidos de longitud debido a que consideramos que tiene mayor flexibilidad y capacidad de estructuración, a fin de emular el epítipo EDE.

Después de tres rondas de selección, se analizaron mediante ELISA clonas de fagos individuales, con el fin de seleccionar las clonas de fagos con mayor capacidad de unión y diferenciar las clonas que se unen específicamente al anticuerpo EDE1 C8, de aquellas que se pudieron haber unido inespecíficamente a las proteínas en la solución de bloqueo o al plástico durante el proceso de selección. Para cada clona, se determinó la unión al anticuerpo EDE1 C8, así como a un control negativo sin anticuerpo. Después, se calculó el porcentaje de unión normalizado usando el control negativo como 100%. En el análisis por ELISA se encontraron 26 clonas cuya absorbancia fue de al menos el doble de absorbancia respecto al control (tabla 3, encerradas o resaltadas), y se secuenciaron 20 de ellas (resaltadas). Después de la secuenciación, se encontró que las clonas que se unieron al anticuerpo están representadas por tres péptidos diferentes: NHHWAHWEQTHT (M1), que se repitió 6 veces, HSPLEKPVPHRS (M2), se repitió 8 veces, y AEGRFHRPLPMG (M3), que se repitió 5 veces (tabla 4). Además, se secuenció una clona que no tenía péptido desplegado (tabla 4). Las clonas de fagos que se seleccionaron durante las rondas de selección pero que no mostraron mayor unión al anticuerpo que al control negativo (tabla 3, no resaltadas ni encerradas) podrían ser falsos positivos que se unen inespecíficamente a las proteínas en la solución de bloqueo o al soporte utilizados durante las rondas de selección. El hecho de que los tres péptidos se hayan encontrado repetidos nos indica que durante el proceso de selección se favoreció la selección de ciertas secuencias desplegadas en el fago sobre todas las demás, debido a su interacción con el anticuerpo.

Se realizaron alineamientos de los péptidos con la proteína E de dengue y Zika. En la figura 10 se muestra el alineamiento del mimótopo 2 (M2) de posición N a C-terminal con la proteína E de dengue. La región N-terminal del péptido se alinea con la posición 94 de la proteína E de dengue, con dos aminoácidos conservados en identidad, dos aminoácidos de alta similitud y un aminoácido de baja similitud (figura 10). La región C-terminal de M2, además, se alinea en la posición 69 de la proteína E de dengue cuando se analiza de C a N-terminal (figura 11), con tres aminoácidos conservados en identidad y un aminoácido con baja similitud. La misma región se alinea también en la posición 69 de la proteína E de Zika, analizado de C a N-terminal (figura 12), con cuatro

aminoácidos conservados en identidad y un aminoácido con baja similitud. Los aminoácidos donde se alinea M2 en la posición 69 están conservados en la proteína E de dengue y Zika, allí la razón de porqué el péptido se alinea en esta posición con la proteína de ambos virus. Además, esta región es importante para la unión del anticuerpo EDE1 C8 a la proteína E de ambos virus, según lo reportado por Barba-Spaeth et al., (2016), al igual que la posición 94 de dengue, donde también se alineó el péptido.

**Tabla 3. Absorbancia del ELISA para determinar la unión de las clonas de fagos al anticuerpo EDE1 C8.**

Clona	% de Abs respecto al control	Clona	% de Abs respecto al control	Clona	% de Abs respecto al control	Clona	% de Abs respecto al control
A1	162	C1	150	D12	163	F12	116
A2	153	C2	148	E1	210	G1	231
A3	200	C3	150	E2	239	G2	204
A4	149	C4	108	E3	246	G3	151
A5	161	C5	136	E4	111	G4	232
A6	78	C6	126	E5	123	G5	139
A7	116	C7	111	E6	93	G6	200
A8	126	C8	112	E7	150	G7	232
A9	125	C9	106	E8	163	G8	115
A10	149	C10	143	E9	209	G9	217
A11	123	C11	143	E10	145	G10	353
A12	135	C12	169	E11	110	G11	138
B1	283	D1	142	E12	140	G12	238
B2	116	D2	106	F1	172	H1	297
B3	160	D3	126	F2	244	H2	268
B4	110	D4	126	F3	184	H3	178
B5	109	D5	164	F4	366	H4	206
B6	184	D6	126	F5	120	H5	86
B7	152	D7	210	F6	152	H6	106
B8	167	D8	159	F7	343	H7	175
B9	99	D9	252	F8	251	H8	100
B10	102	D10	391	F9	143	H9	220
B11	103	D11	237	F10	175	H10	136
B12	106			F11	151	Control Positivo	300

\* Las clonas encerradas o resaltadas en verde muestran aquellas que mostraron una señal de 2 o más veces respecto al control sin anticuerpo; mientras que las clonas resaltadas muestran las clonas seleccionadas para secuenciación.

**Tabla 4. Secuencia de aminoácidos de las clonas seleccionadas**

<b>Clona</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>
A3	No tenía inserto
B1	N H H W A H W E Q T H T
D7	H S P L E K P V P H R S
D9	A E G R F H R P L P M G
D10	N H H W A H W E Q T H T
D11	N H H W A H W E Q T H T
E2	H S P L E K P V P H R S
E3	A E G R F H R P L P M G
F2	H S P L E K P V P H R S
F4	N H H W A H W E Q T H T
F7	N H H W A H W E Q T H T
F8	H S P L E K P V P H R S
G1	H S P L E K P V P H R S
G4	A E G R F H R P L P M G
G7	H S P L E K P V P H R S
G10	N H H W A H W E Q T H T
G12	A E G R F H R P L P M G
H1	A E G R F H R P L P M G
H2	H S P L E K P V P H R S
H9	H S P L E K P V P H R S

En el alineamiento de M2 con la posición 94 de dengue (figura 9), los aminoácidos Val97 y Asp98, correspondientes a la Leu4 y Asp5 del mimótopo, interaccionan mediante enlaces de van der Waals con la cadena pesada del anticuerpo EDE1 C8; mientras que la Arg99, correspondiente a la Lys6 del M2, hace contacto con ambas cadenas del anticuerpo, mediante interacciones polares. Por otro lado, la Ser72 y Arg73 en la proteína E de dengue y Zika, correspondientes a la Ser12 y Arg11 en el mimótopo 2 (figuras 10 y 11), se unen a la cadena ligera del anticuerpo mediante interacciones polares y de van der Waals (Barba-Spaeth et al., 2016). El hecho de que estas interacciones sean clave para la unión del virus por este anticuerpo nos indica que este péptido podría estar mimetizando el epítipo EDE.

Los otros dos péptidos se alinearon con regiones de la proteína que al parecer no están relacionadas con la unión del anticuerpo EDE1 C8. La unión de los péptidos 1 y 3 al anticuerpo EDE1 C8 podría depender 100% de su estructura más que de su secuencia, y probablemente por ello no se



alinearon con las regiones claves para la unión del anticuerpo EDE1 C8 en la proteína E de Zika y dengue. Al comparar los tres péptidos juntos no parecen estar relacionados en secuencia primaria, sin embargo, cuando comparamos M1 con M2, M3 con M2, o M1 con M3, por separado, éstos comparten algunos aminoácidos conservados (figura 13). Esto es más evidente entre los mimótopos 2 y 3, donde podemos encontrar dos aminoácidos conservados en identidad, uno o dos muy similares, dependiendo de si el péptido se analiza de N a C-terminal; y dos aminoácidos poco similares (figura 13). Si bien, de estos aminoácidos sólo los aminoácidos que corresponden a la Leu4, Lys6 y la Ser12 del mimótopo 2, corresponden a aminoácidos que participan directamente en la unión del anticuerpo, los demás residuos conservados en los mimótopos 1 y 3 pueden estar jugando un papel importante en el ambiente químico presente y no se puede descartar que sean importantes en la interacción de los mimótopos con el anticuerpo.

En conclusión, ninguno de los tres mimótopos mostró corresponder completamente con una secuencia continua de aminoácidos derivada de la proteína E, lo que nos dice que son péptidos nuevos y diferentes de la proteína E, que se unen al anticuerpo EDE1 C8 y, por tanto, podrían ser mimótopos del epítipo EDE. El hecho de que los péptidos sean diferentes a la proteína E es parte de los objetivos de generar mimótopos, ya que deseamos eliminar los epítipos que pudieran dar lugar a AMA y deseamos sólo aislar el epítipo EDE.

Existen reportes donde se han encontrado mimótopos tanto con, como sin identidad aparente con el antígeno original. Aun así, éstos últimos han sido capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra virus como el de la encefalitis japonesa (Wu & Lin, 2001) o el virus de la inmunodeficiencia humana (Humbert et al., 2007; Karpenko et al., 2012); así como contra alérgenos (Ganglberger et al., 2000). Además, se ha reportado que durante la obtención de mimótopos de epítipos lineales, se obtienen familias de secuencias que comparten características a nivel de estructura primaria entre ellos; sin embargo, cuando se trata de mimótopos de epítipos estructurales, éstos no comparten similitud en secuencia (O'Rourke et al., 2014), tal como se observó en nuestro caso.

```

M2
E_DENGUE2  1  -----
MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYC 60

M2
E_DENGUE2  61  -----HSPLEK-----
IEAKLTNTTTERCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWNGCGLFGKGGIVTCAKFT 120
                      **  :.:

M2
E_DENGUE2  121 -----
CKKNMEGKIVQPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKITPQSSTTEAELTGYGT 180

M2
E_DENGUE2  181 -----PVP-----
VTMECSPRGTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPWPWLPADTQGSNWIQKETLVTF 240
                      *:.*

M2
E_DENGUE2  241 -----
KNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRRLRMDKQLKLGMSYS 300

M2
E_DENGUE2  301 -----
MCTGKFKIVKEIAETQHGTVIRVQYEGDGSCKIPFEITDLEKRHVLGRLITVNPVITE 360

M2
E_DENGUE2  361 -----
KDSPVNI EAEPFGDSYIIVGVPEPQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAW 420

M2
E_DENGUE2  421 -----HRS-----
DFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVVITWIGMNSRSTLSVSLV 480
                      **

M2
E_DENGUE2  481 -----
LVGVVTLYLGMVQA 495

```

**Figura 10. Alineamiento del mimótopo 2, de N a C-terminal, con la proteína E de dengue 2. Rojo = aminoácidos pequeños e hidrofóbicos, azul = aminoácidos ácidos, magenta = aminoácidos básicos, verde = aminoácidos con grupos hidroxilos, sulfidrilos, aminos o glicina. (\*) = Aminoácidos conservados, (: ) = Aminoácidos con alta similitud, (.) = Aminoácidos con baja similitud.**

```

M2
E_DENGUE2 1  -----
MRCIGISNRDFVEGVSGGSWVDIVLEHGSCVTTMAKNKPTLDFELIKTEAKQPATLRKYC 60

M2
E_DENGUE2 61  -----SRHPV-----
IEAKLTNTTTSRCPTQGEPSLNEEQDKRFICKHSMVDRGWGNGCGLFGKGGIVTCAKFT 120
          ** *

M2
E_DENGUE2 121 -----
CKKNMEGKIVQPENLEYTIVITPHSGEEHAVGNDTGKHGKEIKITPQSSTTEAELTGYGT 180

M2
E_DENGUE2 181 -----
VTMECSPRTGLDFNEMVLLQMEDKAWLVHRQWFLDLPLPWLPGADTQGSNWIQKETLVTF 240

M2
E_DENGUE2 241 -----
KNPHAKKQDVVVLGSQEGAMHTALTGATEIQMSSGNLLFTGHLKCRRLRMDKLQKGMYS 300

M2
E_DENGUE2 301 -----PKELPSH-----
MCTGKFKIVKEIAETQHGTIVIRVQYEGDGPCKIPFEITDLEKRHVLRGLITVNPIVTE 360
          * : *

M2
E_DENGUE2 361 -----
KDSPVNI EAEPFGDSYIIVGVEPGQLKLNWFKKGSSIGQMFETTMRGAKRMAILGDTAW 420

M2
E_DENGUE2 421 -----
DFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIYGAAFSGVSWTMKILIGVITWIGMNSRSTSLVSLV 480

M2
E_DENGUE2 481 -----
LVGVVTLYLGMVQA 495

```

**Figura 11.** Alineamiento del mimótopo 2, de C a N-terminal, con la proteína E de dengue 2. Rojo = aminoácidos pequeños e hidrofóbicos, azul = aminoácidos ácidos, magenta = aminoácidos básicos, verde = aminoácidos con grupos hidroxilos, sulfidrilos, aminos o glicina. (\*) = Aminoácidos conservados, (: ) = Aminoácidos con alta similitud, (.) = Aminoácidos con baja similitud.

```

M2
E_ZIKA 1  -----
          IRCIGVSNRDFVEGMSGGTWVDVLEHGGCVTVMAQDKPTVDIELVTTTTSNMAEVRSYC 60

M2
E_ZIKA 61  -----SRHPVPKE-----
          YEASISDMASDSRCPTQGEAYLDKQSDTQYVCKRTLVDKRGWGNCGGLFGKGS�VTCAKFA 120
          ** * . *

M2
E_ZIKA 121 -----
          CSKMTGKSIQPENLEIRIMLSVHGSQHSGMIVNDTGHETDENRAKVEITPNSPRAEATL 180

M2
E_ZIKA 181 -----LPSH-----
          GGFGLGLDCEPRTGLDFSDLYLTMNKHHLVHKEWFDIPLPWHAGADTGTPHWNNKE 240
          ** *

M2
E_ZIKA 241 -----
          ALVEFKDAHAKRQTVVVLGSQEGAVHTALAGALAEEMDGAKGRLLSSGHLKCRLLKMDKRL 300

M2
E_ZIKA 301 -----
          KGVSYSLCTAAFTFKIPAETLHGTVTVEVQYAGTDGPKVPAQMAVDMQTLTPVGRLLIT 360

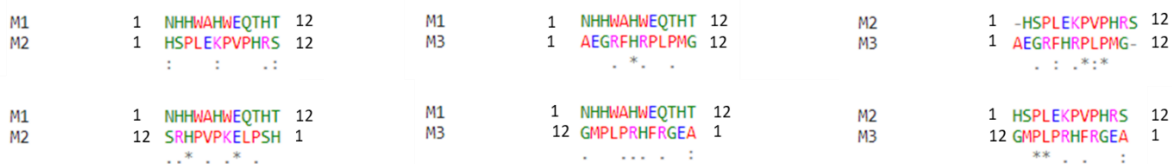
M2
E_ZIKA 361 -----
          ANPVITESTENSKMMLELDPFGDSYIVIGVEKKITHHWHRSGSTIGKAFEATVRGAKR 420

M2
E_ZIKA 421 -----
          MAVLGDТАWDFGSVGGALNSLGGKIHQIFGAAFKSLFGGMSWFSQILIGTLLMWLGLNTK 480

M2
E_ZIKA 481 -----
          NGSISLMCLALGGVLIFLSTAVSA 504

```

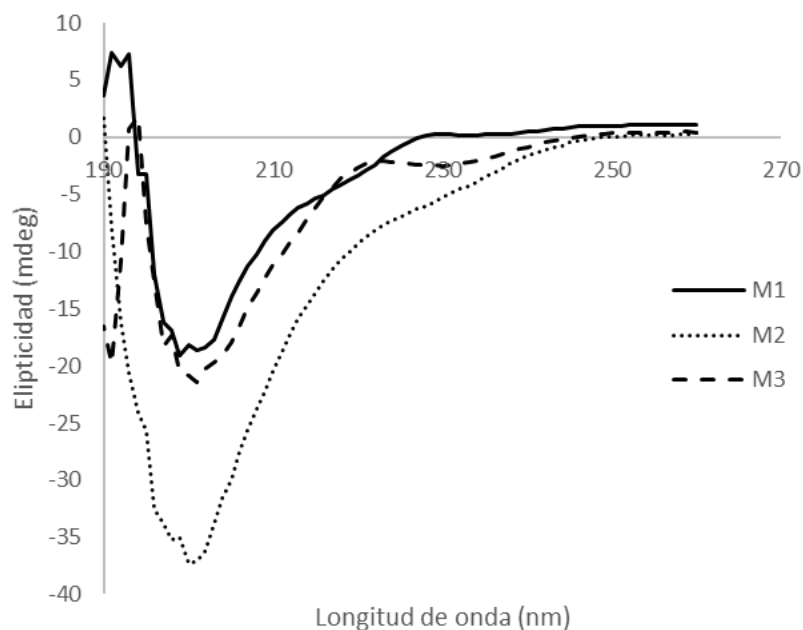
**Figura 12. Alineamiento del mimótopo 2, de C a N-terminal, con la proteína E de Zika. Rojo = aminoácidos pequeños e hidrofóbicos, azul = aminoácidos ácidos, magenta = aminoácidos básicos, verde = aminoácidos con grupos hidroxilos, sulfidrilos, aminos o glicina. (\*) = Aminoácidos conservados, (: ) = Aminoácidos con alta similitud, (.) = Aminoácidos con baja similitud.**



**Figura 13. Alineamientos de los mimótopos. Rojo = aminoácidos pequeños e hidrofóbicos, azul = aminoácidos ácidos, magenta = aminoácidos básicos, verde = aminoácidos con grupos hidroxilos, sulfidrilos, aminos o glicina. (\*) = Aminoácidos conservados, (: ) = Aminoácidos con alta similitud, (.) = Aminoácidos con baja similitud.**

### 6.3 Análisis de la estructura secundaria de los mimótopos y reconocimiento por el EDE1 C8

La espectroscopía de dicroísmo circular es una técnica que permite obtener información acerca de la estructura secundaria de biomoléculas, con base en su absorción diferencial de luz polarizada circularmente hacia la izquierda y derecha. Los tres mimótopos fueron sintetizados y analizados por dicroísmo circular. Después de obtener los espectros de los tres péptidos sintéticos (figura 14), éstos se analizaron utilizando dos programas diferentes disponibles en la web: Bestsel y Dichroweb. En la tabla 5 se resumen los resultados de cada uno. Se puede observar que la estructura predominante para los tres péptidos es de tipo “random coil” o no ordenado (categoría “otros”, en el caso de Bestsel), que es el tipo de estructura más reportada en la literatura para péptidos pequeños (Bakshi, Liyanage, Volkin, & Middaugh, 2014; Cruz-Gatell, 2003; Pérez-Escoda, 2007) y que concuerda con lo observado en los espectros de la figura 14, ya que las secuencias no ordenadas presentan una banda débilmente positiva por encima de 210 nm y fuertemente negativa alrededor de 200 nm o longitudes de onda menores. Sin embargo, también ambos programas coinciden en asignar cierto porcentaje de hojas  $\beta$  antiparalelas (19-39.5%) o hebras, en el caso de Dichroweb, y cuyo máximo es alrededor de 195 nm y mínimo a 215 nm. De igual forma, ambos programas predijeron giros (14.5-28%) en la estructura de los péptidos, lo cual es bastante interesante ya que, debido a su tamaño, estos péptidos son más propensos a formar láminas beta de tipo antiparalelo y, específicamente las láminas beta antiparalelas, generalmente se encuentran enlazadas por medio de un giro.



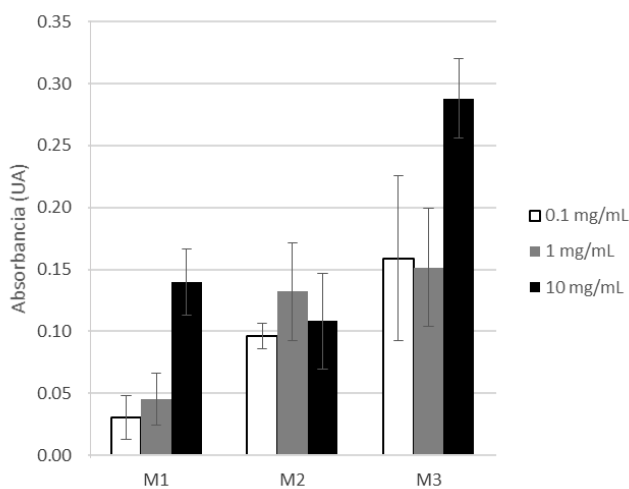
**Figura 14. Espectro de dicroísmo circular del mimótopo 1 (M1), mimótopo 2 (M2) y el mimótopo 3 (M3).**

El epítipo EDE está conformado principalmente por la lámina beta *b* de la proteína E del virus, así como por el loop de fusión (Barba-Spaeth et al., 2016); además, la proteína E es rica en estructuras de tipo hoja  $\beta$ . Para los mimótopos esperábamos encontrar un plegamiento similar y; además, que el plegamiento se conservara para los tres, ya que los tres son mimótopos de un mismo epítipo. Sin embargo, los resultados nos indican que estos péptidos están mayormente desordenados. Además, los resultados del reconocimiento de los péptidos sintéticos por el anticuerpo EDE1 C8, mediante ELISA, no son contundentes (figura 15). Si bien hay una tendencia que indica que a mayor concentración de péptido hay mayor absorbancia, para los péptidos 1 y 3, esto no se observó para el péptido 2; y la señal del reconocimiento es baja para los tres péptidos ( $<0.3$  en el mejor de los casos). Por lo tanto, se puede concluir que los péptidos libres presentan una conformación desordenada y que esto puede estar afectando el reconocimiento por el anticuerpo EDE1 C8. Es probable que los péptidos sintéticos libres se vuelvan más flexibles y estén perdiendo la estructura y rigidez que les confería el estar anclados al bacteriófago. Esta tendencia de los mimótopos a perder el reconocimiento por anticuerpos cuando son separados del contexto del fago ya se ha reportado antes para mimótopos del lipoarabinomanano de *Mycobacterium tuberculosis*, donde observaron que los mimótopos eran

reconocidos sólo desplegados en el fago o conjugados a otras proteínas acarreadoras (Shin et al., 2017).

**Tabla 5. Contenido de estructura secundaria (%) de los péptidos analizados utilizando los programas Bestsel y Dichroweb para el análisis de los datos.**

		M1	M2	M3
Bestsel	Hélices	0	9.3	9.6
	Hoja $\beta$ antiparalela	39.5	31.8	21.9
	Hoja $\beta$ paralela	0	0	1.7
	Giro	15.2	14.5	16.7
	Otros	45.2	44.4	50.1
DichroWeb	Hélice 1	0	1	2
	Hélice 2	8	8	9
	Hebra 1	20	19	22
	Hebra 2	14	11	13
	Giro	23	24	28
	No ordenado	34	35	25



**Figura 15. Reconocimiento de los péptidos libres por el anticuerpo EDE1 C8 por ELISA. Los valores de Abs se muestran normalizados con el control negativo.**

#### 6.4. Inmunizaciones con los fagopéptidos en combinación con los mimótopos libres

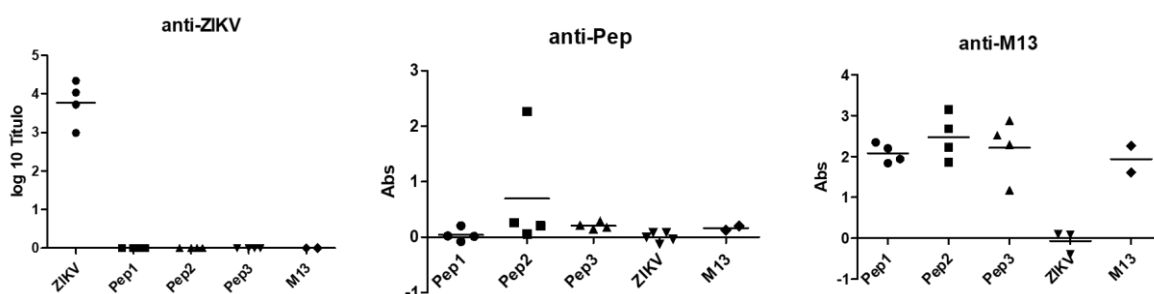
Son varios los retos al realizar inmunizaciones con los fagopéptidos seleccionados por despliegue en fagos o con los péptidos derivados de éstos. Por un lado, los péptidos tan pequeños libres son muy propensos a la degradación y poco inmunogénicos, mientras que los péptidos anclados al bacteriófago se vuelven más estables e inmunogénicos. Sin embargo, en el fago tenemos también otras proteínas que compiten con el péptido por la respuesta inmune. Existen varios reportes en la literatura donde se han obtenido anticuerpos contra los péptidos y el antígeno original, inmunizando con fagopéptidos completos (Delmastro et al., 1997; Humbert et al., 2007); y esto nos motivó a realizar un primer experimento de inmunización con los fagopéptidos, a fin de obtener anticuerpos contra los mimótopos y estudiar si éstos reaccionaban de forma cruzada contra dengue y Zika.

Se diseñó un esquema de inmunización en ratones que usara los fagopéptidos en la primera inmunización y utilizara como refuerzo los péptidos libres (tabla 1), para tratar de dirigir en el refuerzo la respuesta inmune hacia el mimótopo y no hacia las proteínas del fago. Y posteriormente un segundo refuerzo con fagopéptido. Sin embargo, con este experimento no se obtuvieron anticuerpos anti-ZIKV en los grupos inmunizados con los tres fagopéptidos (Pep1-3); ni en el control inmunizado con el fago M13 *wild type*. Sólo observamos anticuerpos contra ZIKV en el grupo control positivo, inmunizado con ZIKV inactivado (figura 16). Cuando analizamos la respuesta inmune hacia los mimótopos (anti-Pep), pudimos observar que no hubo respuesta contra los mimótopos en ninguno de los grupos evaluados. Sin embargo, todos los grupos inmunizados con los fagopéptidos que despliegan los mimótopos (Pep1-3) o con el fago M13, desarrollaron anticuerpos contra el fago M13. Esto nos dice que no hubo respuesta de anticuerpos contra los mimótopos; y por tanto no fue posible observar tampoco si esta respuesta reacciona de forma cruzada con ZIKV o DENV. La respuesta inmune fue desviada hacia las proteínas del fago M13; ya que como observamos en la figura 16, todos los ratones en los grupos, excepto en el control inmunizado con ZIKV, desarrollaron anticuerpos anti-M13.

En conclusión, aún alternando las inmunizaciones con fagopéptidos y péptidos libres, no fue posible obtener respuesta inmunológica contra los mimótopos. La relación péptido:fago es de aproximadamente 1:2000, con base en su peso molecular, esto pudiera ser el principal factor de porqué la respuesta inmune es favorecida hacia las proteínas del bacteriófago y no hacia el péptido desplegado. La explicación del porqué en estudios previos han logrado obtener anticuerpos contra el mimótopo inmunizando con el fagopéptido pudieran ser las diferencias en la vía de administración y en la dosis; ya que dichos estudios usaron inmunización oral y un número de fagos en el rango de



$10^{12}$  por ratón (Delmastro et al., 1997; Humbert et al., 2007). En nuestro caso usamos administración subcutánea y sólo  $9 \times 10^9$  fagos por ratón, ya que estandarizamos el número de fagos para tener el mismo número de epítomos EDE que en el control positivo con ZIKV. Debido a esto, decidimos anclar los péptidos a proteínas acarreadoras que los estabilizaran, los volvieran más inmunogénicos, y que aumentaran el número de repeticiones de péptido por molécula acarreadora, a fin de aumentar la respuesta inmune contra el mimótopo.

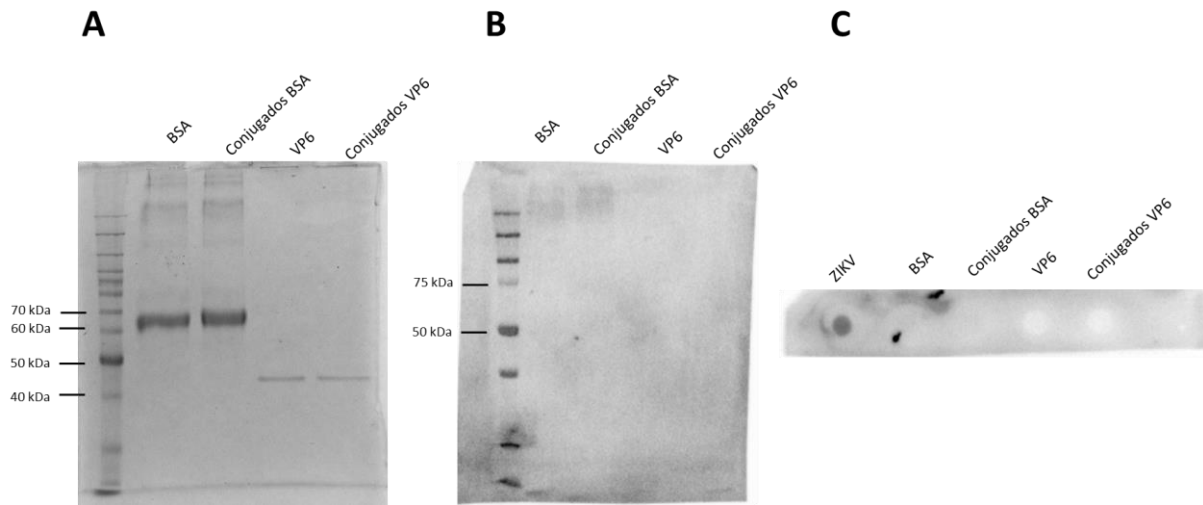


**Figura 16. Determinación de anticuerpos anti-ZIKV, anti-mimótopos (anti-Pep) y anti-M13 de los ratones inmunizados con fagopéptidos y péptidos libres en un ensayo tipo ELISA.**

## 6.5 Conjugación de los mimótopos a proteínas acarreadoras

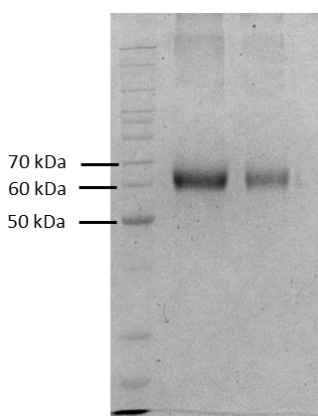
### 6.5.1. Conjugación de los mimótopos por métodos químicos a VP6 y BSA

Para la conjugación de los mimótopos usando métodos químicos se utilizó la reacción con carbodimida (EDC), que conjuga grupos aminos con carboxilos, y que ha sido muy reportada en la literatura como agente de conjugación. Se utilizó también NHS que aumenta la eficiencia de conjugación, estabilizando uno de los intermediarios. La reacción se llevó a cabo en dos pasos: primero se activaron los grupos carboxilo del péptido con EDC y NHS, para posteriormente proceder a la reacción de formación de amida con la proteína acarreadora. Esto con el fin de dirigir la conjugación por medio del extremo C-terminal del péptido, conformación en la que se encuentra desplegado en el fago. Se usaron albúmina bovina (BSA) y nanotubos de VP6 de rotavirus como proteínas acarreadoras a una relación 100:1 péptido:proteína. La primera por ser una proteína modelo, que ya se ha usado en otros trabajos como acarreadora de epítomos; y nanotubos de VP6, debido a que es una proteína altamente inmunogénica; que además se estructura en nanotubos, lo que contribuye más a su inmunogenicidad y reconocimiento por células del sistema inmune (Pastor et al., 2014; Rodríguez et al., 2014).



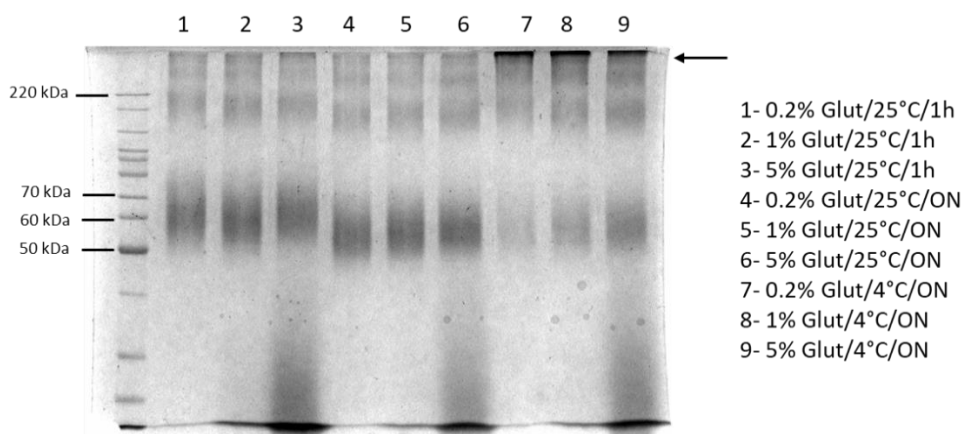
**Figura 17. SDS-PAGE (A), western blot (B) y dot-blot (C) de los conjugados de BSA y VP6 con el péptido 2 (Pep2).**

Los conjugados se analizaron por SDS-PAGE para observar si había aumento en el peso molecular de la proteína acarreadora, lo que indicaría conjugación entre moléculas; y por WB y dot-blot para determinar si los conjugados eran reconocidos por el anticuerpo EDE1 C8. Como se observa en la figura 17, no se observó aumento en el peso molecular de BSA ni de VP6, ni reconocimiento de los conjugados por WB ni dot-blot.



**Figura 18. SDS-PAGE de la reacción de conjugación de BSA sola con optimización de condiciones. A) BSA y B) BSA después de la conjugación.**

Debido a que no hubo aumento en el peso molecular de las proteínas acarreadoras, se determinó que probablemente la reacción no está ocurriendo o que la eficiencia de conjugación era baja, por lo que se decidió optimizar la reacción. Se cambiaron los buffers de conjugación de las dos reacciones, ya que inicialmente se les había reducido la concentración de NaCl a fin de no afectar la estructura de VP6 por la fuerza iónica. La reacción de activación de los grupos carboxilos con EDC y NHS sucede en un intervalo de pH de 4.7-6, y la reacción de formación de amida en pH 7-8, por lo que en un inicio se trabajó el buffer de activación a pH 5.5 y el de reacción a pH 7. Sin embargo, se recomienda que el buffer de activación se use a pH 6 y el de reacción a pH 7.2-7.5, por lo que se cambió el pH y concentración de NaCl de los buffers a lo recomendado. Además, se aumentó la concentración de proteína de 0.7 mg/mL a 10 mg/mL; y el tiempo de incubación de 2 h a temperatura ambiente a toda la noche a 4°C. En esta optimización se probó BSA sin péptido. En la figura 18 se observa que no se aumentó la eficiencia de conjugación con estos cambios, ya que no se observa un aumento en el peso molecular de la proteína.



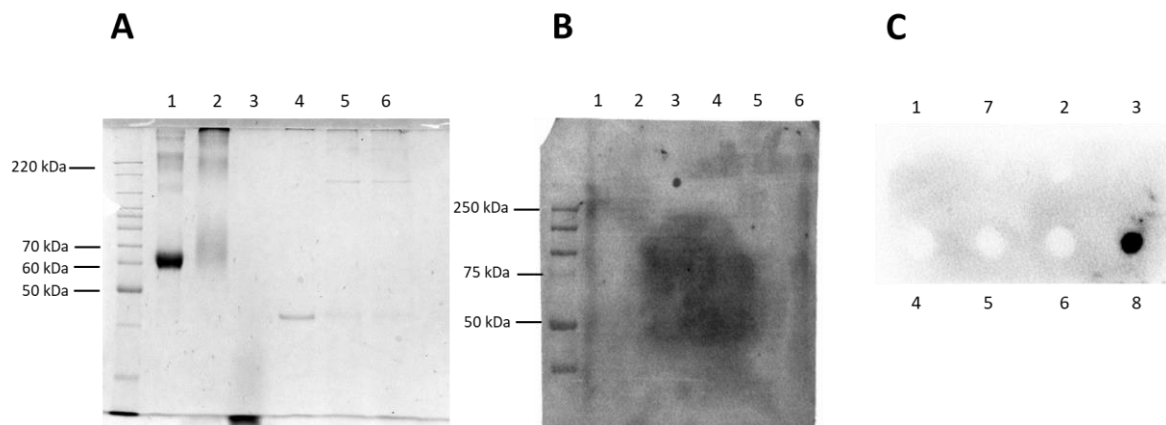
**Figura 19. Optimización de las condiciones de reacción para la conjugación con glutaraldehído (Glut) a diferente temperatura (25 o 4°C), concentración de glutaraldehído (0.2%, 1% o 5%) y tiempo de incubación (1 h o toda la noche, ON). La flecha muestra los productos de la conjugación.**

Se decidió, entonces, probar otro método de conjugación. Para ello se decidió utilizar glutaraldehído, un método de conjugación más astringente, aunque menos específico. Para saber qué condiciones eran las óptimas para la conjugación, se varió la concentración de glutaraldehído y el tiempo y temperatura de incubación. En estas reacciones se probó BSA sola sin péptido para optimizar las condiciones antes de proceder a la conjugación con péptido. En la figura 19 se aprecia que las mejores condiciones fueron incubación a 4°C toda la noche (ON), con cualquier concentración de

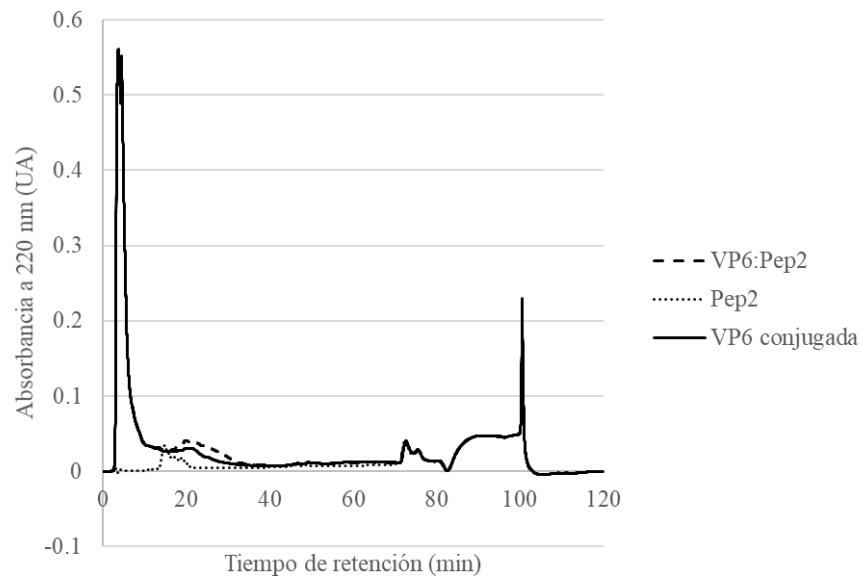
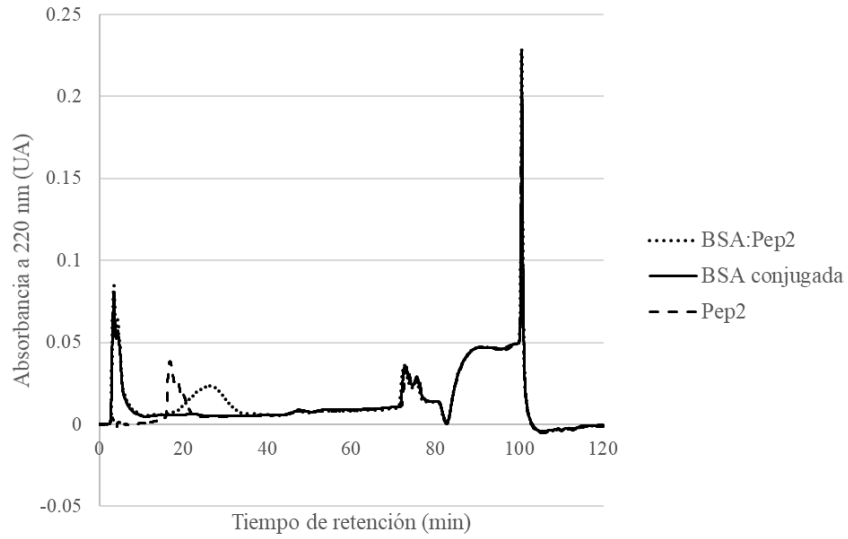
glutaraldehído de las probadas, ya que se observa la desaparición de la banda correspondiente a BSA sin conjugar (66 kDa) y la aparición de productos de alto peso molecular.

Entonces se procedió a conjugar el péptido 2 a BSA y VP6, utilizando las condiciones determinadas (0.2% de glutaraldehído, incubando toda la noche a 4°C) y dos concentraciones de péptido: exceso molar de 20 y de 100, respecto a la proteína acarreadora. En la figura 20A se observa que la reacción de conjugación ocurre, ya que se puede ver la aparición de bandas de mayor peso molecular. Sin embargo, no hay reconocimiento de los conjugados por el anticuerpo EDE1 C8 en WB ni en dot-blot (figura 20B y C). Ante este resultado, existen dos posibilidades: que el péptido no se esté conjugando, y que lo que vemos que aparece de mayor peso molecular sea proteína conjugada consigo misma, o que el péptido sí se esté conjugando, pero una vez unido la conformación que adopta no sea reconocida por el anticuerpo.

Para contestar esta interrogante, se analizaron las reacciones de conjugación por HPLC fase reversa para determinar la eficiencia de conjugación. En la figura 21 se muestran los cromatogramas del péptido 2, del control de reacción con sólo BSA o VP6 y de la reacción de conjugación del péptido 2 con BSA y VP6. Como se observa, el péptido eluye alrededor del minuto 16, y no se observa algún producto correspondiente a ese tiempo de elución en los cromatogramas de las reacciones de conjugación, por lo que no parece ser un problema de eficiencia de conjugación.



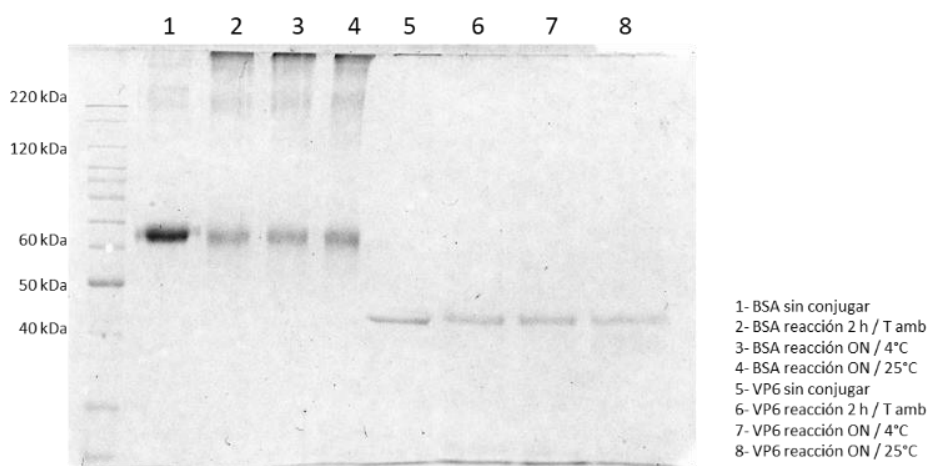
**Figura 20. SDS-PAGE (A), Western blot (B) y dot-blot (C) de los conjugados con glutaraldehído. Las reacciones de conjugación del péptido 2 con las proteínas acarreadoras (BSA y VP6). 1 = BSA, 2 = BSA conjugada con el péptido 2 en relación 1:20, 3 = BSA conjugada con el péptido 2 en relación 1:100, 4 = VP6, 5 = VP6 conjugada con el péptido 2 en relación 1:20, 6 = VP6 conjugada con el péptido 2 en relación 1:100, 7 = BSA conjugada sin péptido y 8 = Virus Zika inactivado.**

**A****B**

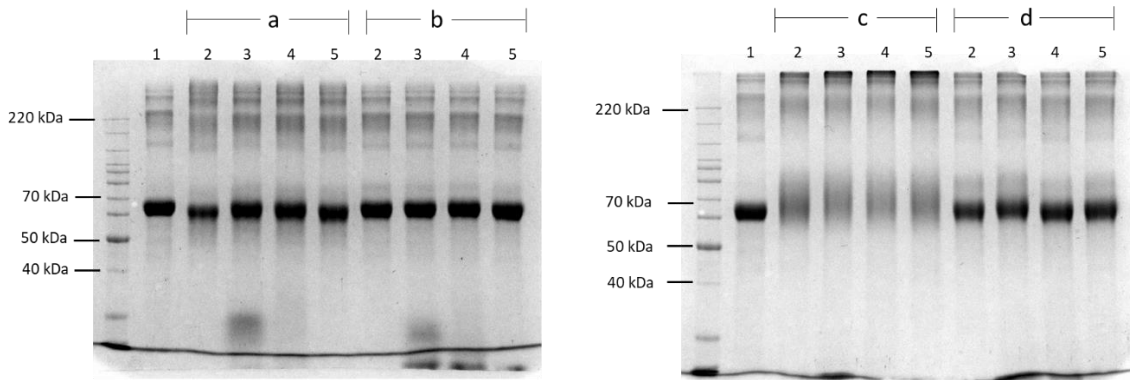
**Figura 21. Cromatogramas de HPLC fase reversa de los conjugados con VP6 (A) Y BSA (B). VP6:Pep2 = conjugados del péptido 2 con VP6, BSA:Pep2 = conjugados del péptido 2 con BSA, Pep2 = péptido 2 libre.**

Hasta este punto, se trabajó sólo con el péptido 2, a fin de estandarizar una técnica de conjugación antes de proceder a la conjugación de los tres péptidos. Sin embargo, como se observa, después de la conjugación el péptido 2 no fue reconocido por el anticuerpo EDE1 C8. Entonces, se procedió a conjugar los péptidos 1 y 3 para averiguar si alguno de éstos era reconocido por el anticuerpo después de conjugarlos.

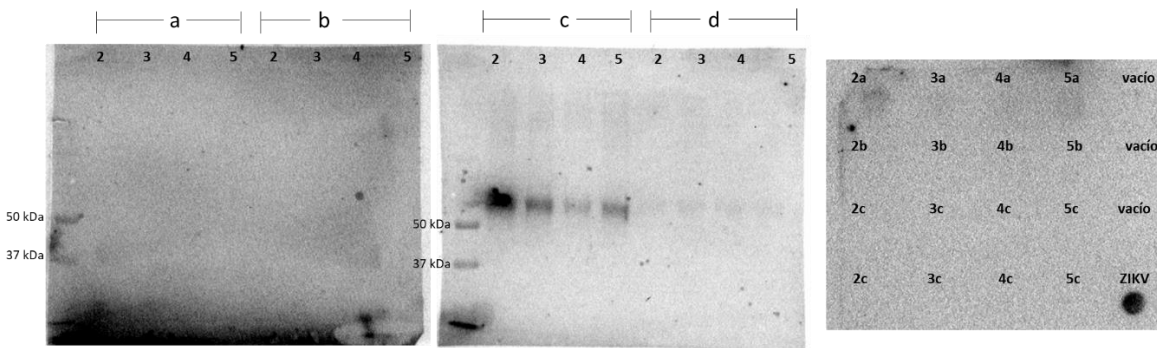
Se probaron las diferentes metodologías de conjugación: EDC, EDC en presencia de NHS y conjugación con glutaraldehído. Se utilizaron reactivos EDC y NHS nuevos que, a diferencia de los probados con el péptido 2, sí funcionaron para la conjugación, en reacciones con buffer MES para cuando se usó EDC sola, o en buffer de boratos para cuando se usó EDC con NHS (figura 22). Además, los péptidos fueron reducidos con TCEP antes de llevar a cabo las reacciones con EDC en presencia de NHS. Los tres péptidos tienen una cisteína en su extremo C-terminal, por lo que pensamos que si estaban oxidados y unidos entre sí por medio de puentes disulfuro, podrían conjugarse en una conformación diferente a la necesaria para el reconocimiento por el anticuerpo; la adición de un agente reductor estuvo encaminada a prevenir esto. Además, se realizaron las reacciones tanto sin activar los péptidos; como reacciones secuenciales en donde primero se activaron los péptidos con EDC y NHS; a fin de activar el carboxilo y dirigir la reacción hacia la conjugación de éstos con proteína acarreadora, como se ha mencionado anteriormente. Los resultados se resumen en las figuras 22-24.



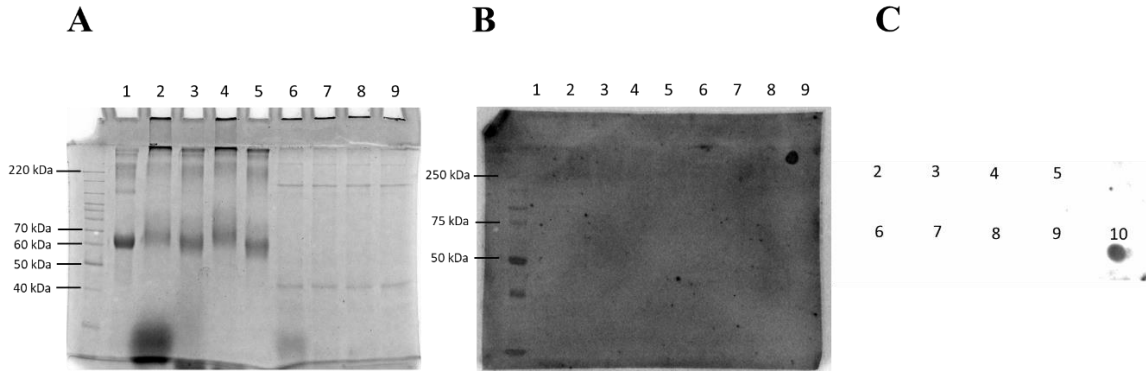
**Figura 22. SDS-PAGE de la conjugación de BSA y VP6 con EDC en buffer MES pH 5 sin NaCl. Reacciones sin péptido a temperatura ambiente (T amb), 25°C o 4°C e incubadas durante 2 h o toda la noche (ON).**



**Figura 23. SDS-PAGE de las reacciones de conjugación con EDC (a), EDC con NHS (b), EDC con NHS y TCEP (c) y reacciones secuenciales (d). 1 = BSA, 2 = BSA conjugada sin péptido, 3 = BSA conjugada con el péptido 1, 4 = BSA conjugada con el péptido 2, 5 = BSA conjugada con péptido 3**



**Figura 24. Western blot (izquierda y centro) en presencia del anticuerpo EDE1 C8; y dot blot (derecha) de las reacciones de conjugación con EDC (a), EDC con NHS (b), EDC con NHS y TCEP (c) y reacciones secuenciales (d). 1 = BSA, 2 = BSA conjugada sin péptido, 3 = BSA conjugada con el péptido 1, 4 = BSA conjugada con el péptido 2, 5 = BSA conjugada con péptido 3. ZIKV =Virus Zika inactivado.**



**Figura 25. SDS-PAGE (A), western blot (B) y dot-blot (C) de las reacciones de conjugación con glutaraldehído. 1 = BSA, 2 = BSA conjugada sin péptido, 3 = BSA conjugada con el péptido 1, 4 = BSA conjugada con el péptido 2, 5 = BSA conjugada con péptido 3, 6 = VP6 conjugada sin péptido, 7 = VP6 conjugada con el péptido 1, 8 = VP6 conjugada con el péptido 2, 9 = VP6 conjugada con el péptido 3, 10 = Virus Zika inactivado.**

Las reacciones con mayor eficiencia de conjugación fueron aquéllas llevadas a cabo con EDC, NHS y TCEP; así como las conjugadas con glutaraldehído, lo cual se puede observar en el SDS-PAGE (figuras 19, 20, 22 y 23) con la aparición de productos de alto peso molecular. Sin embargo, en ninguna de las condiciones ni con ninguno de los tres péptidos logramos obtener productos que fueran reconocidos en Western blot o dot blot por el anticuerpo EDE1 C8 (figuras 24 y 25); sólo se observó el ruido de fondo.

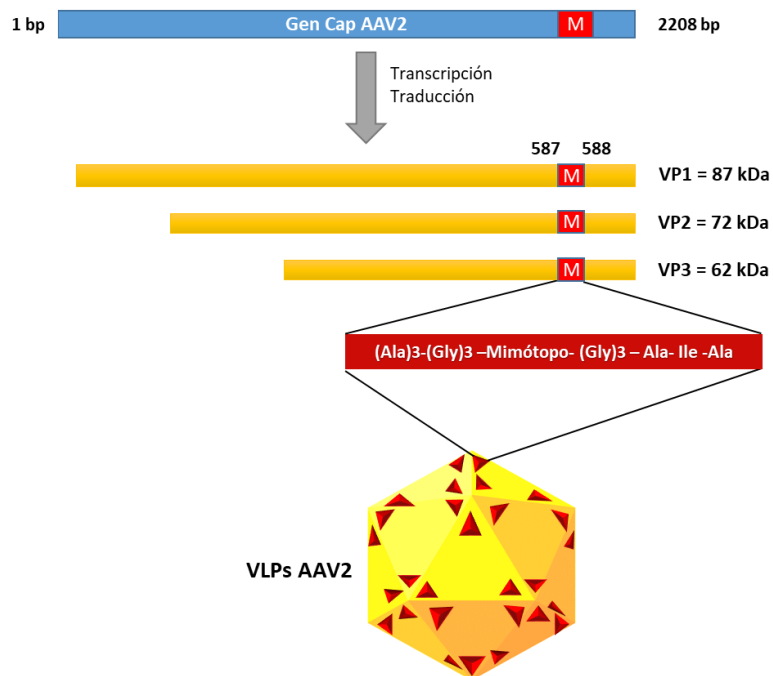
### 6.5.2. Despliegue de los mimótopos en la cápside del AAV2

Para el despliegue de los mimótopos en partículas pseudovirales (VLPs) del virus adenoasociado serotipo 2 (AAV2), se procedió a modificar la secuencia de nucleótidos del gen Cap del AAV2, el cual codifica para las proteínas estructurales del virus. La modificación del gen Cap en la posición 1,758 con la secuencia codificante de cada mimótopo, corresponde a una modificación en las posiciones 587, 450 y 385 de VP1, VP2 y VP3, respectivamente (figura 26). Adicional a la secuencia codificante de los mimótopos, se añadió la secuencia codificante de los aminoácidos AAAGGG en cada extremo del mimótopo, con el fin de brindar flexibilidad para que los mimótopos se plieguen de manera adecuada. Se espera que las proteínas se ensamblen en partículas pseudovirales que despliegan en su superficie los mimótopos (figura 26).

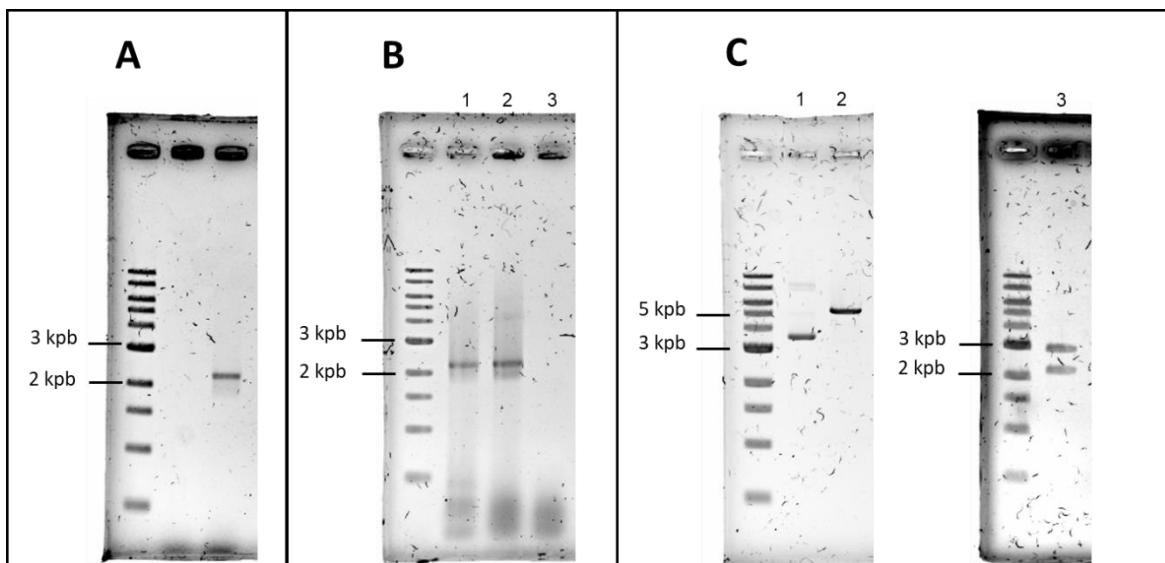
El gen Cap se amplificó a partir del genoma de un baculovirus recombinante que posee dicho gen, y amablemente donado por el Dr. Robert M. Kotin (University of Massachusetts Medical



School). El oligonucleótido FwAAV2CAP\_ACG, utilizado para la amplificación del gen Cap contiene un codón de inicio ACG, así como un elemento de 9 nucleótidos antes del codón de inicio, que favorece el inicio de la traducción y la expresión de las tres proteínas estructurales del AAV2 en la relación adecuada en células de insecto, según lo reportado previamente por Urabe, Ding, y Kotin, (2002). La amplificación dio un producto de 2.1 kilopares de bases (kpb), correspondiente al tamaño del gen Cap (figura 27A). El producto de la amplificación se ligó con el vector pJET1.2/blunt y el resultado de la ligación se usó para transformar células *E. coli*. Se realizó una PCR de colonia para analizar las colonias obtenidas después de la transformación. La PCR de la colonia 2, da como producto el tamaño esperado del gen Cap (2.2 kpb) (figura 27B). Además, la digestión con enzimas de restricción del plásmido extraído de la colonia 2, dio como resultado los productos esperados de 5.1 kpb en el caso del plásmido lineal, y de 2.2 kpb y 2.9 pb para la doble digestión con EcoRI y XbaI (figura 27C). De esta forma se obtuvo el plásmido pJET-Cap\_AAV2.

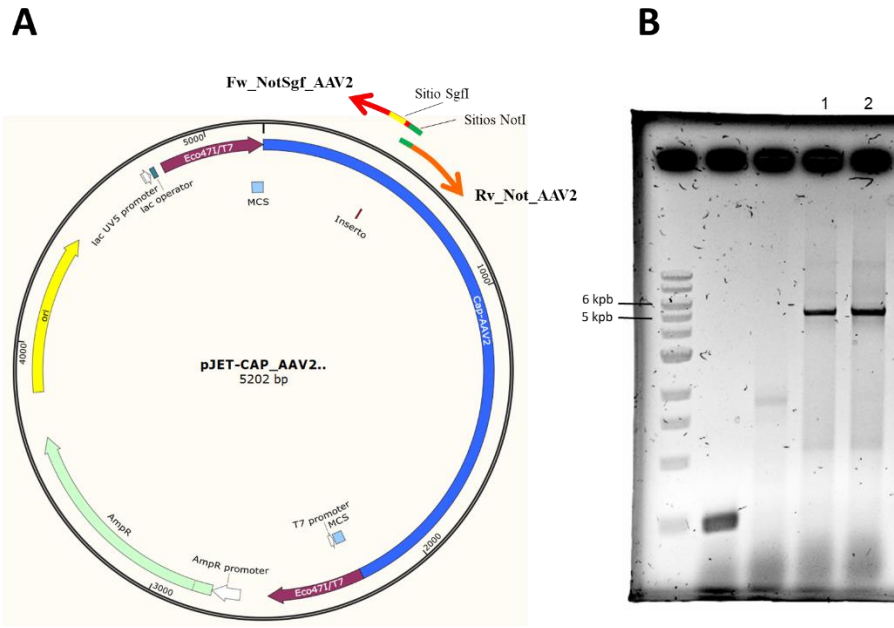


**Figura 26. Estrategia para el despliegue de los mimótopos en la cápside del virus adeno-asociado 2. La secuencia de cada mimótopo se insertó en el gen Cap que da lugar a las tres proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 del virus adeno-asociado 2 (AAV2) las cuales se autoensamblan y forman partículas pseudovirales (VLPs).**



**Figura 27. A) Amplificación del gen Cap del AAV2. B) PCR de colonia de la transformación de células *E. coli* con el plásmido pJET-Cap\_AAV2, control positivo (1), colonia 1 (2) y colonia 2 (3). C) Plásmido Pjet-Cap\_AAV2 (1), digerido con EcoRI (2) y digerido con EcoRI y XbaI (3).**

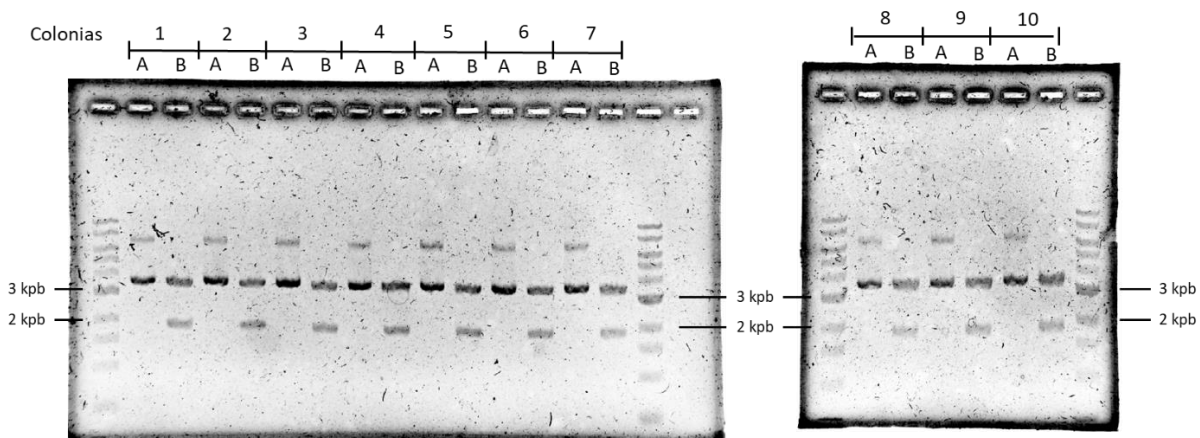
Para insertar la secuencia de los fragmentos codificantes para los mimótopos dentro de la secuencia del gen Cap, fue necesario introducir los sitios de corte de las enzimas NotI y SgfI. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos que primaran alrededor de la posición 1,761 del gen Cap, que codifica para la asparagina 587 de la proteína VP1, donde se deseaba insertar la secuencia de los mimótopos. Los oligonucleótidos, además, contenían los sitios de corte de las enzimas. En la figura 28A, se ilustra el sitio de primado de los oligonucleótidos utilizados, así como el sentido de la PCR divergente utilizada para la amplificación del plásmido pJET-Cap\_AAV2. En la figura 28B, se muestra el producto de la amplificación del plásmido con los sitios de interés, que corresponde con el tamaño esperado de 5.2 kpb. El producto de la PCR se fosfató en los extremos, se ligó para circularizarlo y se utilizó para transformar células de *E. coli*.



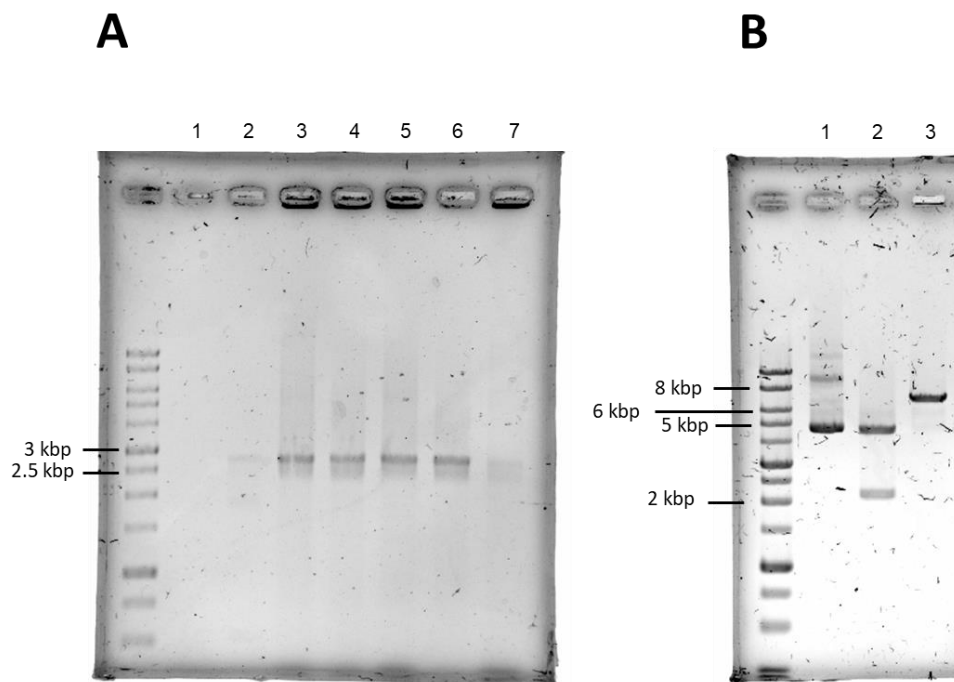
**Figura 28. A) Esquema de la PCR divergente utilizado para modificar el gen Cap del AAV. B) Gel de agarosa 0.8% donde se observó el producto de la PCR divergente obtenido con la enzima Phusion (1) y con la enzima Q5 (2).**

Se seleccionaron 10 colonias resultantes de la transformación, se crecieron en medio LB y se extrajo el plásmido de cada una; el cual se sometió a digestión con NotI. La digestión del plásmido que contiene el gen Cap modificado con los sitios NotI y SgfI, da como resultado dos productos de 1.8 y 3.4 kpb. Mientras que el plásmido con el gen Cap no modificado sólo es linealizado. En la figura 29 se puede observar que todas las colonias elegidas contienen el plásmido con el gen Cap modificado. Se eligió la colonia 2 para seguir trabajando. El plásmido resultante se denominó pJET-Cap\_NotSgf.

El gen Cap modificado se escindió del plásmido pJET-Cap\_NotSgf y se clonó en el vector Pfast-Bac1 mediante reacciones de digestión con las enzimas EcoRI y XbaI y posterior ligación. El producto de la ligación se utilizó para transformar células de *E. coli*. Se seleccionaron cinco colonias, que se analizaron por PCR utilizando los oligonucleótidos Fw\_pFast y Rv\_pFast. En la figura 30A se muestra que el producto amplificado corresponde al tamaño esperado de 2.6 kpb, para el plásmido pFast-Bac1 con el inserto del gen Cap modificado. Este plásmido se denominó pFAST-CapAAV2-NotSgf. El plásmido se digirió con enzimas de restricción para corroborar su identidad, resultando en los fragmentos esperados (figura 30B).

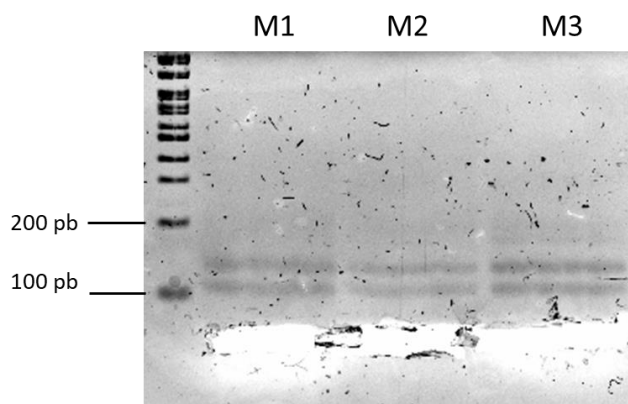


**Figura 29.** Gel de agarosa al 0.8% que muestra el análisis del patrón de restricción del plásmido pJET-CapAAV2-NotSgf extraído de las diferentes colonias transformadas. A=Plásmido sin digerir, B=Plásmido digerido con NotI.



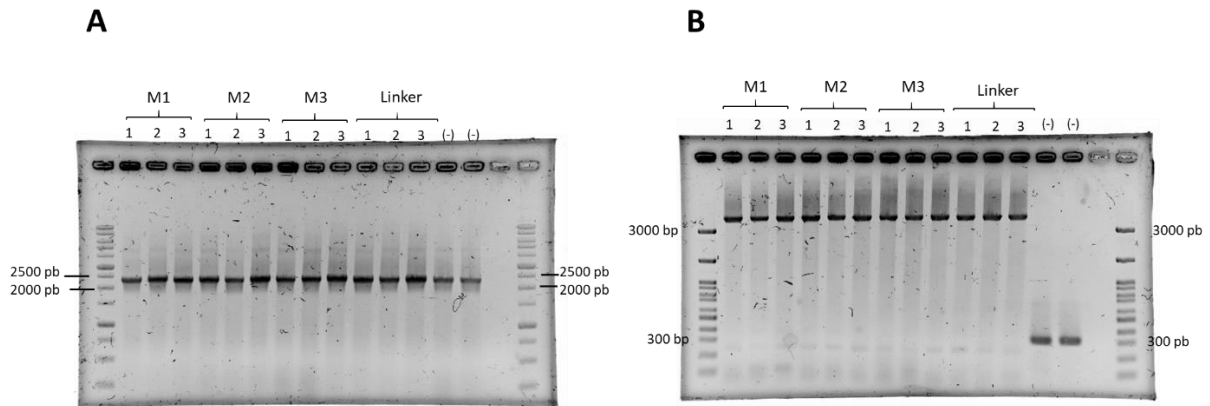
**Figura 30.** A) Análisis por PCR de las células *E. coli* transformadas con el plásmido Pfast-CapAAV2-NotSgf, control negativo (1), control positivo (2), colonias analizadas (3-7). B) Plásmido Pfast-CapAAV2-NotSgf purificado (1), digerido con EcoRI y XbaI (2) y digerido con SgfI (3).

Los fragmentos codificantes para M1, M2 y M3 fueron sintetizados por un tercero. Estos fragmentos contienen la secuencia de ADN para cada mimótopo, flanqueada por la secuencia de tres residuos de glicina y tres residuos de alanina (linker) y la secuencia de los sitios de corte de las enzimas NotI y SgfI (302 pares de bases en total). Además, contienen secuencias de solapamiento con el gen Cap del serotipo 8 del AAV en cada extremo. Para la liberación de la secuencia de M1, M2 y M3, con los residuos del linker, los fragmentos se sometieron a digestión con dichas enzimas de restricción, lo que da lugar a un fragmento de 109 pares de bases (pb), otro de 133 pb y uno de 60 pb. Para la purificación de los fragmentos de interés (60 pb), los productos de las reacciones de digestión se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 3%, y posteriormente se escindieron, tal como se muestra en la figura 31, para su purificación y ligación con el plásmido pFast-CapAAV2-NotSgf, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Además, el plásmido pFast-CapAAV2-NotSgf se sometió a digestión con la enzima NotI, se purificó y se ligó para circularizarlo; con el fin de obtener el gen Cap modificado sólo con el linker que sirviera de control negativo. Los productos de las reacciones de ligación se utilizaron para transformar células de *E. coli*. Se seleccionaron dos colonias resultado de cada transformación, se crecieron en medio LB y se extrajo el plásmido. Se corroboró por secuenciación la integridad del gen Cap, así como la inserción de los fragmentos codificantes para M1, M2, M3 y linker. De esta forma se obtuvieron los plásmidos pFAST-Cap-M1, pFAST-Cap-M2, pFAST-Cap-M3 y pFAST-Cap-Linker, que funcionaron como plásmidos donadores.



**Figura 31. Gel de agarosa de bajo punto de fusión (3%) mostrando los fragmentos de la digestión con SgfI y NotI de los fragmentos codificantes para M1, M2 y M3 y su escisión del gel. Las bandas restantes en el gel (>100 pb) corresponden a secuencias en el fragmento que no eran de interés.**

Se transformaron células DH10Bac con los plásmidos donadores. Estas células contienen el genoma del baculovirus en forma de replicón (bácmido), en el cual existen secuencias de recombinación con los plásmidos donadores, de tal forma que se pueden insertar genes de interés en el genoma del baculovirus. Cuando se insertan los genes de interés en el bácmido, se interrumpe el gen *lac Z*, por lo que después de transformar, se seleccionaron colonias blancas. Además, la inserción del gen de interés se corroboró mediante PCR de colonia (figura 32). La PCR con los oligonucleótidos Fw\_sequencing y Rv\_M13, que priman en el gen Cap, y el bácmido, respectivamente, corroboró la presencia del gen Cap en las colonias analizadas, al amplificar el fragmento del tamaño esperado de 2.3 kpb (figura 32A); mientras que la PCR con los oligonucleótidos M13, que priman en el bácmido, corroboró que se había llevado a cabo la recombinación, al obtenerse un fragmento de 4.6 kpb, el cual es de 300 bp cuando no hay recombinación (figura 32B). De esta forma se generaron los cuatro bácmidos recombinantes.



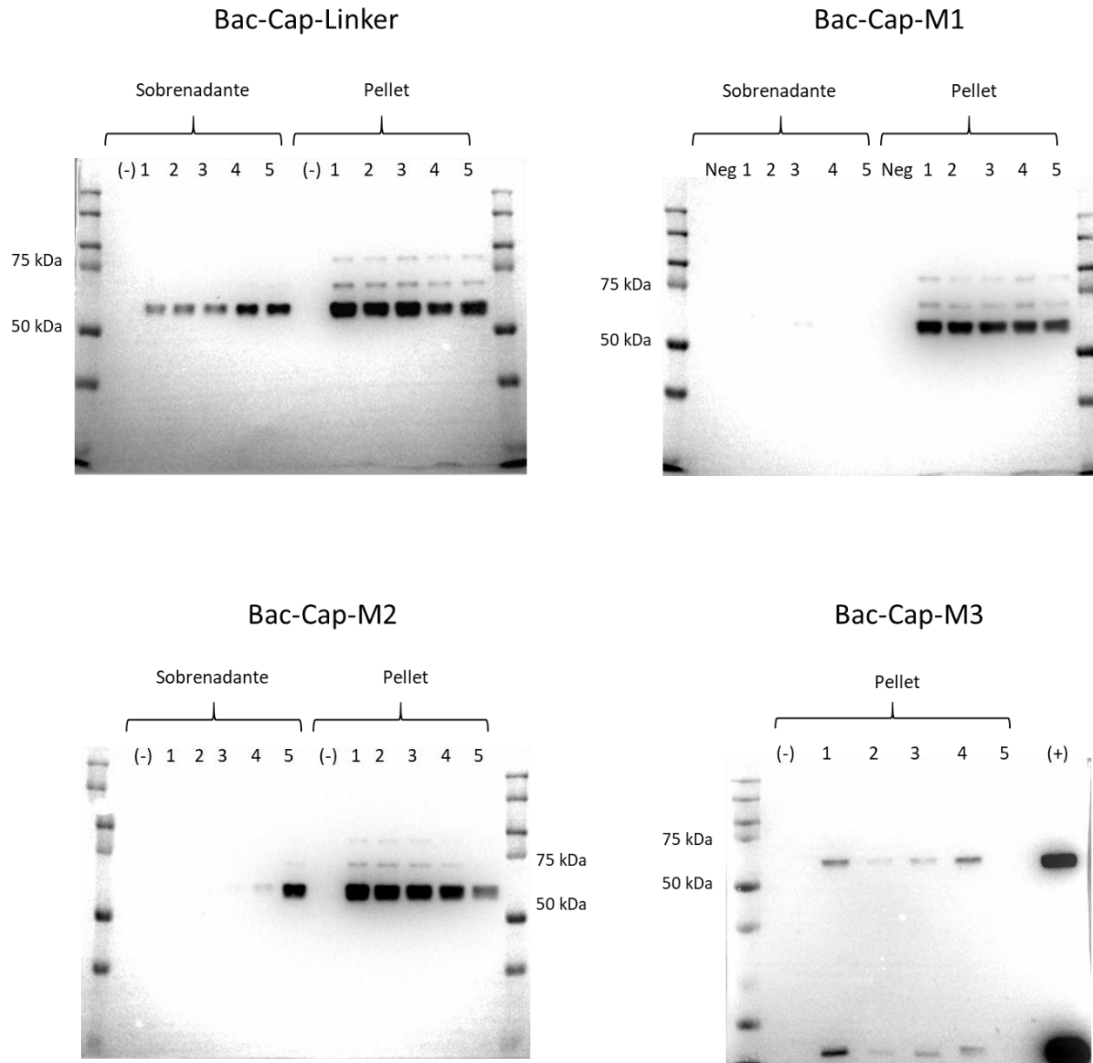
**Figura 32. Análisis por PCR de las células *E. coli* DH10Bac transformadas con los plásmidos pFast-Cap-M1, pFast-Cap-M2, pFast-Cap-M3 y pFast-Cap-Linker usando los oligonucleótidos Fw\_sequencing y Rv\_M13 (A) y Fw\_M13 y Rv\_M13 (B). Se muestran tres colonias analizadas en cada caso (1-3); así los como controles negativos (-).**

Para obtener los baculovirus recombinantes, los bácmidos se purificaron y se utilizaron para transfectar células SF9. La expresión de las proteínas estructurales del AAV se corroboró mediante western blot. El sobrenadante de las células transfectadas se utilizó para infectar un nuevo cultivo de células SF9 y colectar el sobrenadante, generando un stock de cada baculovirus recombinante. Los

baculovirus recombinantes se denominaron Bac-Cap-M1, Bac-Cap-M2, Bac-Cap-M3 y Bac-Cap-Linker, según la secuencia que despliegan las proteínas del AAV.

Se analizó el stock de cada baculovirus mediante ensayo en placa, a fin de seleccionar una placa que correspondiera a una población lo más homogénea posible de baculovirus y que fuera, de entre las seleccionadas, la mejor productora. Se utilizó cada placa para infectar células SF9 y se analizaron el sobrenadante y el pellet de cada cultivo. En la figura 33 se muestra el análisis por western blot de los diferentes cultivos. En cada caso, se observó la expresión de las proteínas estructurales del AAV: VP1 (87 kDa), VP2 (72 kDa) y VP3 (62 kDa); las cuales se localizaron principalmente en la fracción celular. Esto concuerda con lo reportado previamente para las proteínas estructurales del AAV, las cuales permanecen en la fracción celular, debido a la señal de localización nuclear que ubica a las proteínas en los sitios de ensamblaje viral en el núcleo durante una infección. Se observó, además, que las proteínas se expresan en la proporción de 1:1:10 para VP1, VP2 y VP3, respectivamente, descrita previamente durante una infección.

En el caso de las placas provenientes del Bac-Cap-Linker, todas las placas analizadas mostraron una cantidad similar de proteína en el pellet; sin embargo, el western blot sugiere que las placas 1, 2 y 3 presentaron menor cantidad de proteína en el sobrenadante del cultivo, comparadas con las placas 4 y 5. Esto pudiera ser debido a que las primeras generan menos lisis celular que las segundas. La lisis celular genera fuga de la proteína al sobrenadante, la cual no es recuperada para su purificación. Además, mayor muerte y lisis celular podría tener un impacto en la calidad de la proteína recuperada. Debido a esto, se eligió la placa 1. La misma lógica se siguió para las placas del Bac-Cap-M2, en donde la placa 5 presentó mayor fuga de proteína al sobrenadante. En este caso se eligió la placa 1. En el caso del Bac-Cap-M1, no se observó ninguna diferencia entre las placas analizadas y se eligió la placa 1. Para el Bac-Cap-M3, se observó una banda de proteína de bajo peso molecular que podría corresponder a un producto de degradación. De las placas evaluadas, las placas 1, 2 y 3 presentaron una señal de proteína degradada igual o mayor a la banda observada para la proteína VP3; mientras que con la placa 5 no se observó expresión de las proteínas de interés. Se eligió la placa 4, donde la señal para la proteína degradada fue menor que para la proteína VP3. Cabe mencionar que de los baculovirus evaluados, con el Bac-Cap-M3 se expresó menor cantidad de proteína recombinante. La causa de esto pudiera estar relacionada con la secuencia del mimótopo 3, ya que esta es la única diferencia entre los baculovirus evaluados.



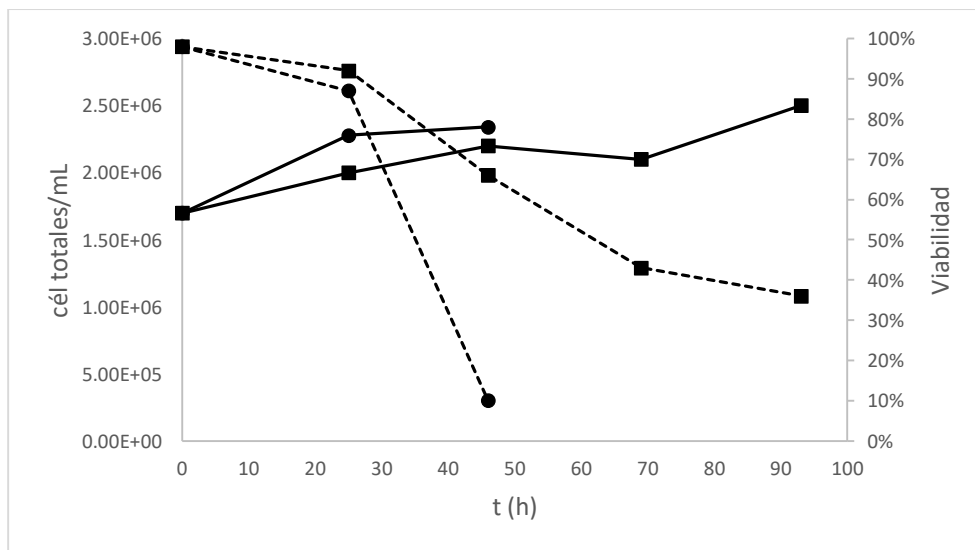
**Figura 33. Análisis por western blot de la expresión de las proteínas modificadas de la cápside del AAV2, en células SF9 infectadas con diferentes placas de baculovirus (1-5).**

El sobrenadante de los cultivos infectados con la placa elegida de baculovirus se utilizó para infectar un nuevo cultivo de células SF9 y obtener así el pase 1 del baculovirus. Este pase se tituló por el método de viabilidad celular y se utilizó para obtener el pase 2 o banco de trabajo. Para la producción de las VLPs modificadas de AAV2 se utilizó el pase 2.

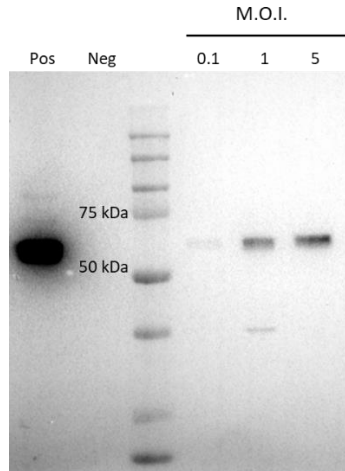
Durante la obtención de los pases de baculovirus pudimos observar que, bajo las condiciones estándar a las cuales produjimos las VLPs, las células morían mucho más rápido que al estar infectadas con un baculovirus que contiene el gen Cap sin modificar (Bac-Cap-AAV2). Esto se aprecia en la figura 34. Al estar infectadas con el Bac-Cap-AAV2, la viabilidad desciende a entre 30



y 40% alrededor de las 96 h.p.i., momento en el cual se cosechan las VLPs. Sin embargo, en el caso de los baculovirus recombinantes que contienen el gen Cap modificado con la secuencia del linker o de los mimótopos y el linker, a las 48 h.p.i. la viabilidad ya es del 10% (figura 35). Esto llamó nuestra atención, debido a que tiempos cortos de cultivo podrían impactar en la cantidad de proteína recombinante que obtenemos. Debido a esto, decidimos modificar la M.O.I., uno de los factores que más afecta la viabilidad celular. Realizamos infecciones a diferentes M.O.I., utilizando el Bac-Cap-M2, y analizamos la cantidad de proteína recombinante obtenida en el pellet en cada caso. De forma sorprendente, los cultivos alcanzaron una viabilidad celular de 7% alrededor de las 48 h.p.i, independientemente de si se usó una M.O.I. de 1 o 5. Además, pudimos observar que a M.O.I. de 5 se obtuvo la mayor cantidad de proteína recombinante (figura 35). Con esto, pudimos concluir que, de las condiciones evaluadas, la mejor M.O.I. para la obtención de las VLPs es de 5, a pesar del rápido descenso en la viabilidad del cultivo. Sin embargo, durante este trabajo no probamos M.O.I. más bajas, que dieran lugar a un descenso en la viabilidad más lento y, por lo tanto, mayores tiempos de cultivo. Una perspectiva sería evaluar si dichas condiciones tienen un impacto en la cantidad y calidad de las VLPs. Por otro lado, nuestros resultados sugieren que las VLPs modificadas pudieran ser más tóxicas para las células que las VLPs nativas, o que los baculovirus recombinantes obtenidos durante este trabajo son más infecciosos o más letales para las células.



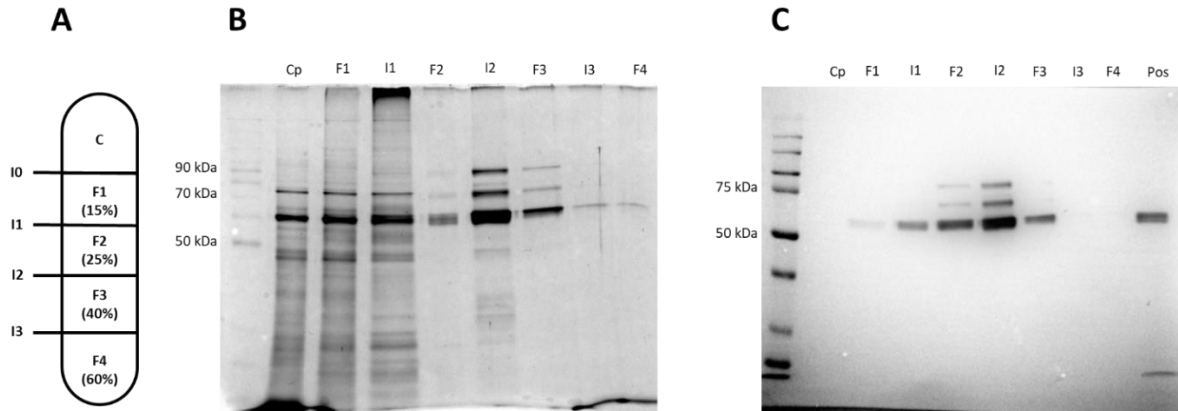
**Figura 34. Cinética de crecimiento (—) y viabilidad celular (- -) durante la infección con Bac-Cap-M2 (●) y Bac-Cap-AAV2 (■).**



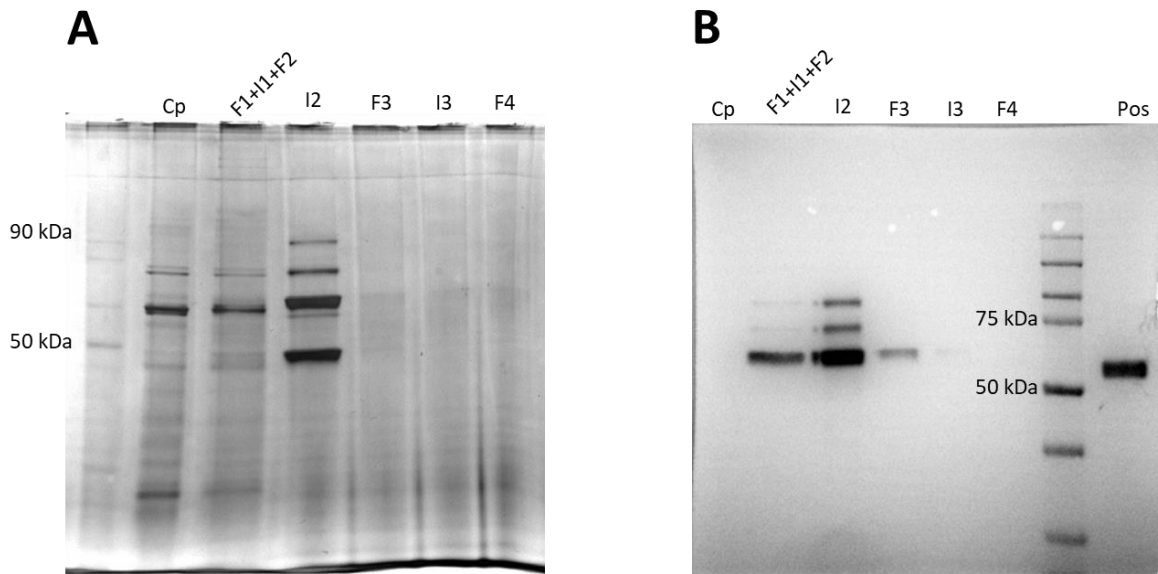
**Figura 35. Western blot del pellet celular a diferentes M.O.I. utilizando el Bac-Cap-M2.**

Las VLPs se purificaron mediante ultracentrifugación a través de un gradiente de yodixanol. Las fracciones se analizaron por western blot y SDS-PAGE, a fin de determinar las fracciones que estuvieran enriquecidas con las proteínas estructurales del AAV2. En las figuras 36 y 37 se puede observar que la fracción I2 es la más enriquecida en VLPs, la cual además posee un alto grado de pureza. Cuando la purificación se hace en tubos de 38 mL en vez de tubos de 14 mL, la proteína, además, se localiza en las fracciones I1 y F2; tanto las VLPs nativas como las modificadas (figura 38). En los experimentos posteriores, durante la purificación de grandes cantidades de VLPs en tubos de 38 mL, se colectaron las fracciones I1, F2 e I2.

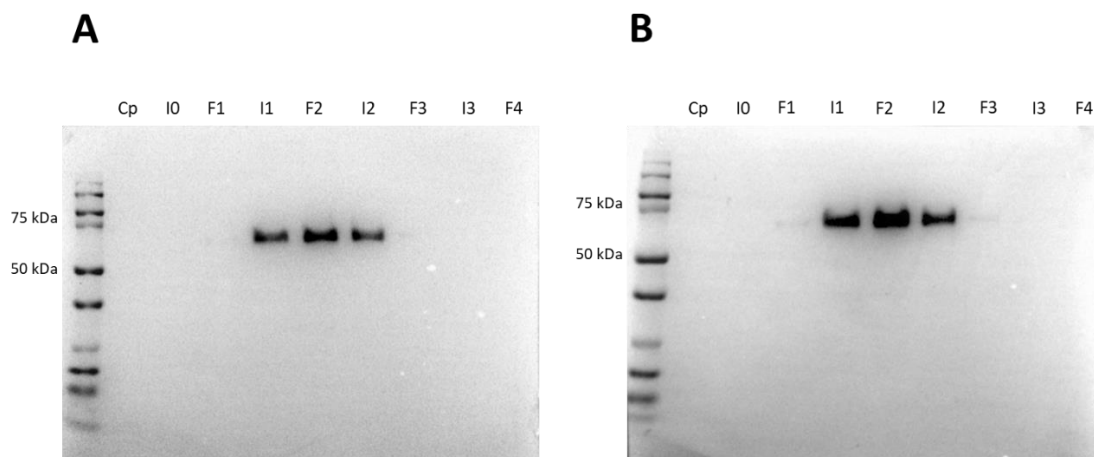
En la figura 37 se aprecia que, además de las bandas correspondientes a las proteínas estructurales del AAV2, hay una banda muy prominente de menor peso molecular (<50kDa). En Western blot, esta banda no es reconocida por el anticuerpo B1, que reconoce a las tres proteínas VP. Para tratar de elucidar el origen de esta banda, se llevó a cabo un mapeo con diferentes anticuerpos. El anticuerpo A1 reconoce a la proteína VP1 en su extremo N-terminal, el anticuerpo anti-GP64 reconoce a la proteína GP64 del baculovirus; mientras que el anticuerpo A69 reconoce a VP1 y VP2.



**Figura 36.** A) Esquema de las fracciones a diferentes concentraciones de yodixanol utilizadas durante la purificación de las VLPs Cap-Linker. B) SDS-PAGE y C) Western blot de las fracciones obtenidas. C= Clarificado, F1= Fase 1, F2= Fase 2, F3= Fase 3, I0=Interfase 0, I1= Interfase 1, I2= Interfase 2, I3= Interfase 3, Cp= Clarificado procesado por ultracentrifugación, Pos= Control positivo.



**Figura 37.** A) SDS-PAGE y B) Western blot de las fracciones obtenidas durante la purificación de las VLPs Cap-M2. C= Clarificado, F1= Fase 1, F2= Fase 2, F3= Fase 3, I0=Interfase 0, I1= Interfase 1, I2= Interfase 2, I3= Interfase 3, Cp= Clarificado procesado por ultracentrifugación, Pos= Control positivo.



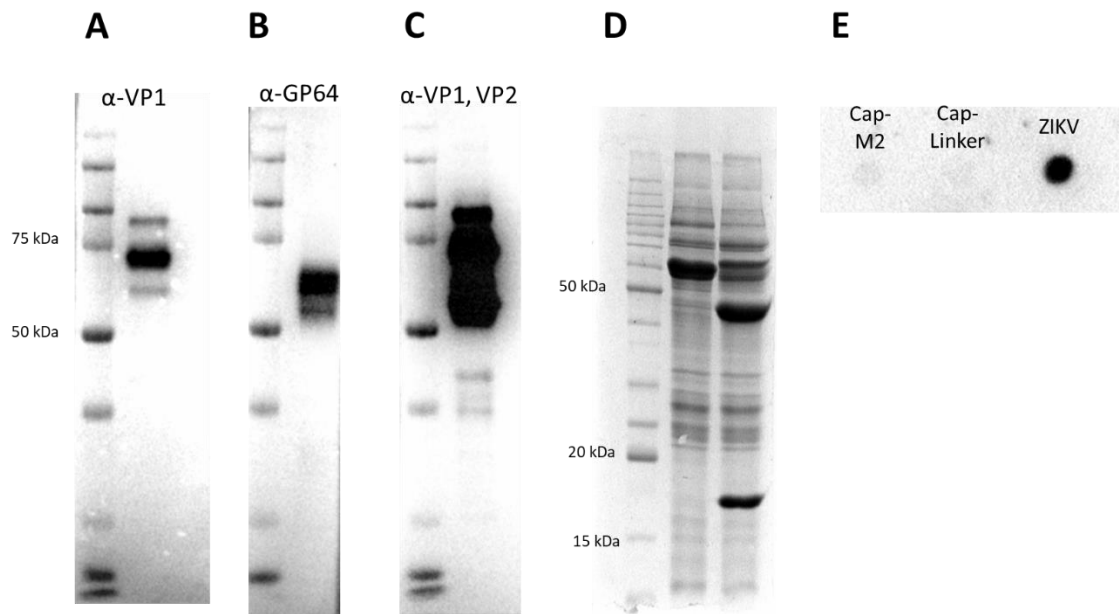
**Figura 38. Western blot de las fracciones obtenidas durante la purificación en tubos de 38 MI de las VLPs sin modificar del AAV2 (A) y las VLPs Cap-M2. Las abreviaturas corresponden a lo señalado en la figura.**

En la figura 39 se aprecia que la banda de menor peso molecular observada no corresponde al extremo N-terminal de VP1, ya que en el western blot no se apreció ninguna señal por debajo de 50 kDa que fuera reconocida por el anticuerpo A1. Sin embargo, es relevante que pudimos observar algunas bandas de menor peso molecular al esperado para VP1. Estas bandas pudieran ser productos de degradación de VP1. Estos productos de degradación todavía conservan el extremo N-terminal del VP1, ya que son reconocidos por el anticuerpo A1, por lo tanto, es posible que la degradación de la proteína esté ocurriendo en el extremo C-terminal, justo donde se insertó la secuencia de los mimótopos.

En la figura 39 se observa que la banda menor a 50 kDa de la figura no corresponde a la proteína GP64 o a algún fragmento de ésta, ya que no fue reconocida por el anticuerpo anti-GP64. Finalmente, en el western blot con el anticuerpo A69, se observa una banda que corresponde con el peso molecular de la banda observada en la figura 37A. Esta banda es menos intensa que las señales observadas de mayor peso molecular. Esto corresponde con la información de la ficha técnica del anticuerpo, que señala que el anticuerpo A69 reconoce mejor VP1 que VP2. Al haber observado una señal (<50 kDa) en el western blot con el anticuerpo A69 (anti-VP1), mas no con el anticuerpo A1 (anti-VP1,VP2), se puede deducir que la banda observada en la figura 37A (<50 kDa) corresponde a un producto de degradación de la proteína VP2. De manera importante, la degradación debe estar ocurriendo en el extremo C-terminal de la proteína, ya que el anticuerpo A69 reconoce el extremo N-terminal. Esto, además, concuerda con lo observado en el western blot con el anticuerpo B1 (figura

37-B), donde no se observó reconocimiento de la banda de menor peso molecular, ya que el anticuerpo B1 reconoce el extremo C-terminal de las proteínas VP1, VP2 y VP3. Por lo tanto, la degradación ocurre en el C-terminal.

La proteína VP2 tiene un peso molecular de 72 kDa, asumiendo que la banda observada en la figura tiene un peso molecular de 45 kDa, se puede deducir que el fragmento del C-terminal que está perdiendo la proteína incluye al mimótopo y que el fragmento de 45 kDa restante ya no incluye el mimótopo. Como se describió anteriormente, durante el análisis con el anticuerpo A1, también se observó degradación de la proteína VP1 en el C-terminal. Además, después del procesamiento de la muestra por diafiltración, su análisis por SDS-PAGE mostró una disminución significativa en la cantidad de VP3 en la muestra, respecto al control Cap-Linker, y se observó una banda prominente alrededor de 17 kDa (figura 39D). El peso molecular de 45 kDa más 17 kDa da como resultado el peso molecular de VP3 (62 kDa). Finalmente, las VLPs obtenidas no fueron reconocidas por el anticuerpo EDE1 C8 en dot-blot, por lo que concluimos que no contenían la secuencia del mimótopo (figura 39E).

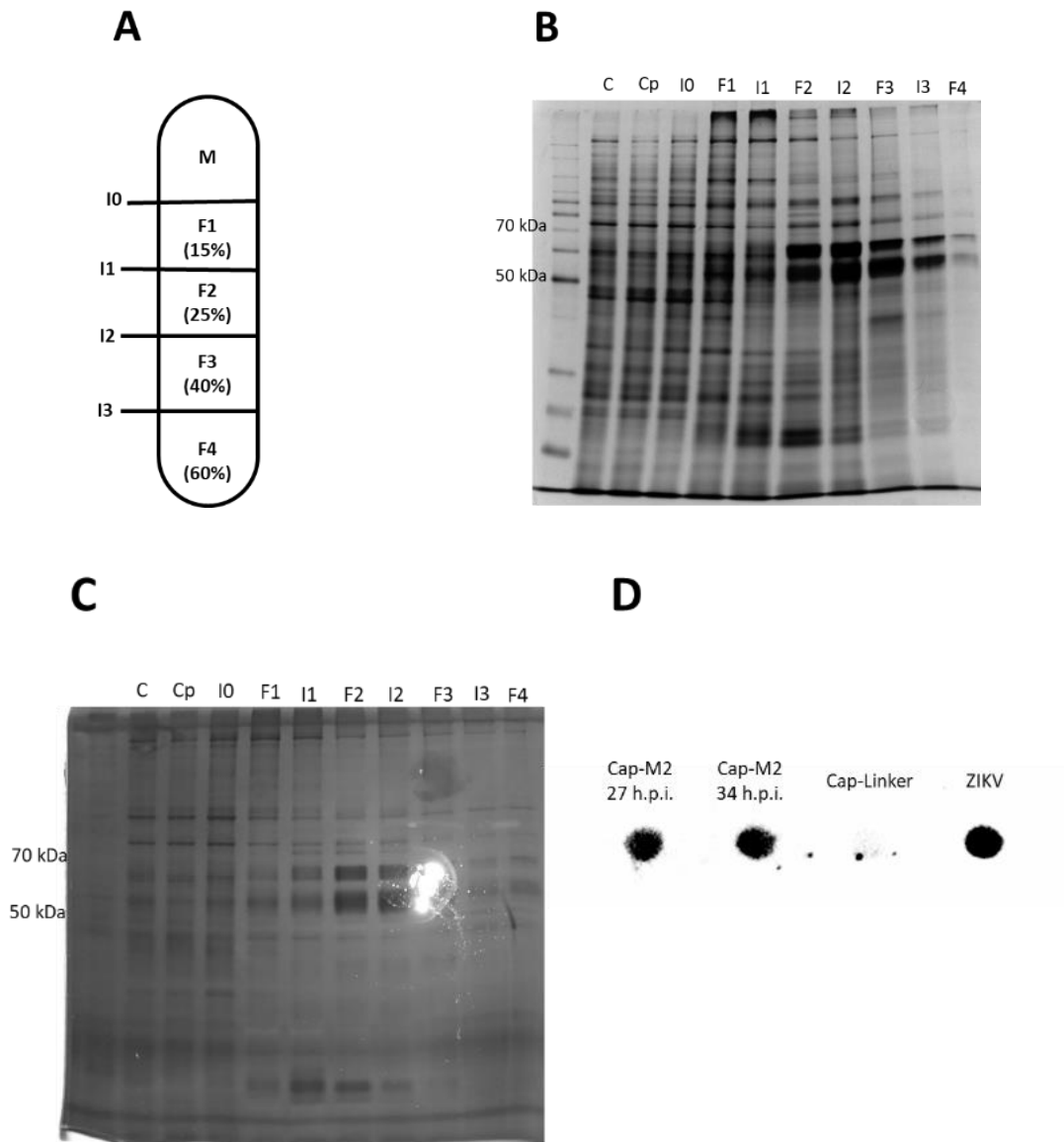


**Figura 39. Análisis por western blot de las VLPs Cap-M2 con el anticuerpo A1 (A), anti-GP64 (B) y A69 (C). D) DS-PAGE de las Cap-Linker (izquierda) y Cap-M2 (derecha). E) Dot-blot de las Cap-M2 en presencia del anticuerpo EDE1 C8.**

Con esta información, concluimos que las proteínas estructurales del AAV2 modificadas con el mimótopo 2 eran propensas a degradación. La evidencia recabada apunta a que pudieran ser las tres proteínas, y no una en específico las que están siendo degradadas. El factor en común en cada caso es que la degradación ocurre en el extremo C-terminal de las proteínas, donde se insertó el mimótopo. Es probable que la inserción de la secuencia hiciera más susceptible a las proteínas al corte por proteasas en esa región, al dejar más expuestas regiones en las proteínas que antes estaban al interior de su estructura, o que la secuencia del mimótopo sea blanco de corte de las proteasas celulares. Un análisis en varios servidores, para encontrar posibles sitios de corte por proteasas en la secuencia del mimótopo 2, arrojó que existen múltiples sitios en el mimótopo 2 que pudieran ser blanco de proteasas.

Debido a que las partículas obtenidas no desplegaban el mimótopo en la superficie, fue necesario llevar a cabo estrategias encaminadas a inhibir su degradación. Decidimos optimizar el tiempo de cultivo durante su producción, a fin de limitar el contacto de las VLPs con las proteasas celulares; además de añadir una mezcla de inhibidores de proteasas durante su extracción.

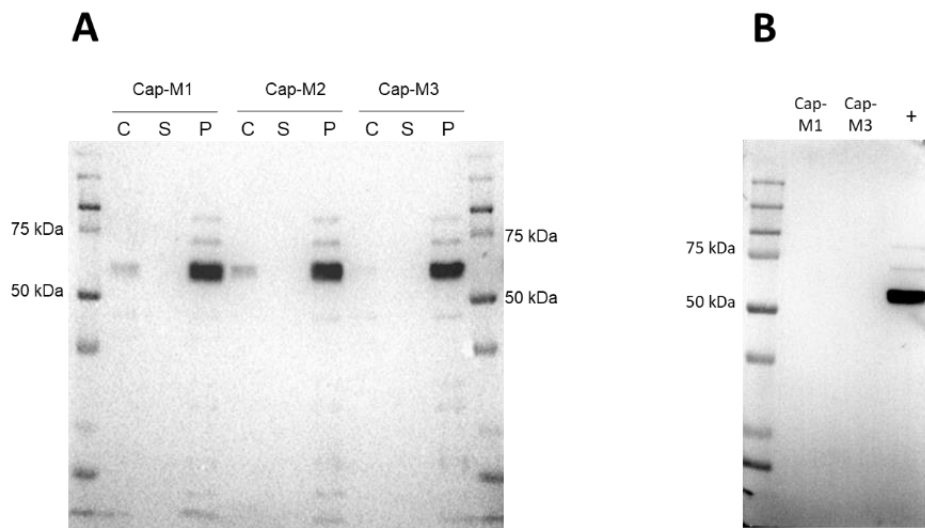
Las células SF9 se infectaron a M.O.I 5 con el Bac-Cap-M2 y se cosechó el cultivo a las 27 h.p.i. y 34 h.p.i., cuando la viabilidad era de 64 y 27%, respectivamente. Posteriormente, se extrajeron las VLPs en presencia de inhibidores de proteasas; y se purificaron en un gradiente de yodixanol. Las fracciones se analizaron por SDS-PAGE y se muestran en la figura 40. Tal como se observa, las fracciones enriquecidas en VLPs fueron la F2, I2, F3 e I3. En esta ocasión pudimos observar las tres bandas correspondientes a las tres proteínas estructurales que forman la VLP y, adicionalmente, una banda prominente por debajo de VP3. En esta ocasión, la banda extra se encuentra por arriba de los 50 kDa, a diferencia de lo observado en la figura 37A, donde esta banda se encuentra por debajo de los 50 kDa. Esto significa que, si bien todavía hay degradación de las proteínas estructurales del AAV2, se ha inhibido parcialmente su degradación. De forma importante, las cápsides cosechadas y purificadas de esta manera fueron reconocidas por el anticuerpo EDE1 C8, lo que nos demuestra que estas VLPs contienen el mimótopo 2. No encontramos diferencia significativa en el perfil de proteínas observado en la cosecha a 27 o 34 h.p.i. Las producciones posteriores de las Cap-M2, a mayor escala, se hicieron cosechando a 27 h.p.i. y extrayendo en presencia de inhibidores de proteasas. Con estas modificaciones, y usando el protocolo descrito en la siguiente sección para las VLPs Cap-M3, en las siguientes purificaciones se pudo reducir de forma casi total la presencia de la banda contaminante, tal como se aprecia en la figura 41.



**Figura 41. A) Esquema de las fracciones recolectadas durante la purificación de las Cap-M2. B) SDS-PAGE de las fracciones recolectadas durante la purificación de las Cap-M2 cosechadas a 34 h.p.i. (B) o a 27 h.p.i. (C) en presencia de inhibidores de proteasas. D) Dot-blot de las Cap-M2 puras con el anticuerpo EDE1 C8.**

Posteriormente, se estudió la producción de las VLPs que contienen el mimótopo 1 y 3. Durante el primer intento de purificación no se recuperaron VLPs durante la purificación. Las VLPs de AAV2 son extraídas de la fracción celular después del cultivo, debido a que las proteínas no contienen una señal de secreción. Después del proceso de extracción, las VLPs son recuperadas en el

sobrenadante (clarificado). Sin embargo, al analizar las diferentes fracciones después de la extracción, se observó que las VLPs, en su mayoría, todavía permanecían en la fracción insoluble (figura 42A). Para las Cap-M2, después de varios lotes de producción, pudimos observar que la cantidad de proteína extraída era suficiente para los experimentos posteriores, sin embargo, éste no fue el caso para las Cap-M1 y Cap-M3, ya que la mayoría de las veces, la cantidad de proteína extraída era indetectable por western blot (figura 42B).



**Figura 42. Las partículas pseudovirales con el mimótopo 1 (Cap-M1) mimótopo 2 (Cap-M2) o mimótopo 3 (Cap-M3) se produjeron de acuerdo a lo detallado en materiales y métodos y se analizaron las diferentes fracciones. A) Western blot del clarificado extraído (C), sobrenadante del cultivo (S) o pellet después de la extracción (P) de las VLPs. B) Western blot de los clarificados indicados. El control positivo corresponde al Cap-Linker.**

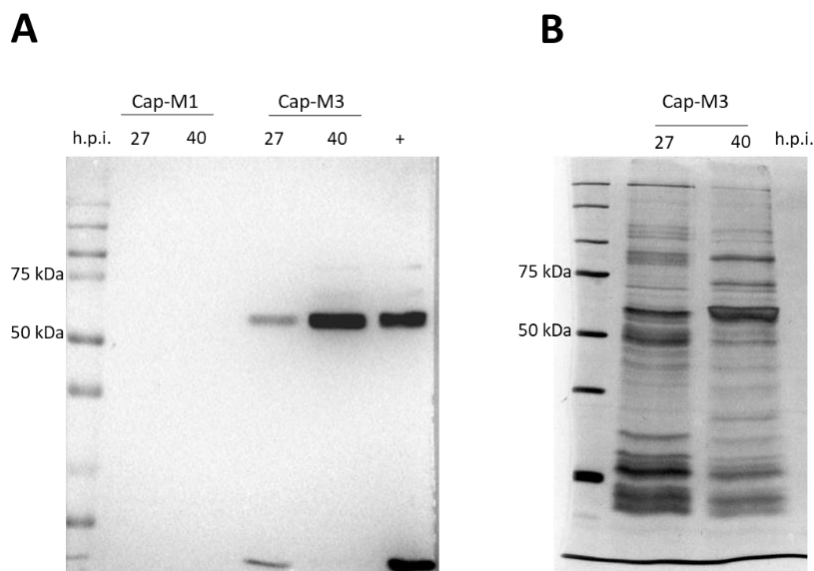
Durante una búsqueda en la literatura acerca de los factores que pueden afectar la extracción de las VLPs de AAV2, encontramos que la digestión del ADN celular es un paso muy importante durante la extracción de estas VLPs. Las proteínas de las cápsides virales tienen la función de empaquetar el ácido nucleico viral, por lo que estas proteínas suelen tener secuencias que les permiten formar complejos con el ADN o ARN. Durante la extracción de las VLPs del AAV2, generalmente se incluye un paso de digestión del ADN celular, debido a que el acomplejamiento de las proteínas con el ADN puede dar lugar a precipitados que hacen que las proteínas virales permanezcan en la fracción insoluble. Nuestro método de extracción incluye un paso de digestión con benzonasa, justo después de la lisis celular. Sin embargo, durante la revisión de la literatura, encontramos que el



acomplejamiento de las proteínas virales con los ácidos nucleicos puede darse en tiempos muy cortos, por lo que es común que la digestión de ADN se haga antes de la lisis celular. Además, se ha observado que la concentración de benzonasa y la concentración celular a la cual se resuspende el pellet, pueden tener un impacto en la recuperación del AAV2. Por ejemplo, se ha reportado que la resuspensión del pellet a una concentración de  $1 \times 10^7$  células/MI, previo a su digestión con benzonasa, da una mayor recuperación que la resuspensión del pellet a  $2 \times 10^7$  células/MI, aun con la misma concentración de benzonasa en ambos casos (Chahal, Aucoin, & Kamen, 2007).

Con la evidencia recabada, decidimos adecuar el protocolo de extracción de las VLPs del AAV2 que se había usado hasta el momento, con las siguientes modificaciones: el pellet celular se resuspendió a una concentración de  $1 \times 10^7$  células totales/MI, en vez de  $1 \times 10^7$  células viables/MI; y la adición e incubación con benzonasa se llevó a cabo antes de la lisis celular, en vez de hacerla después de la lisis. En la figura 43A, se observa el análisis por western blot del clarificado obtenido para las Cap-M1 y Cap-M3 usando el nuevo protocolo. Como se aprecia, con estas modificaciones logramos extraer las VLPs Cap-M3, mas no las Cap-M1.

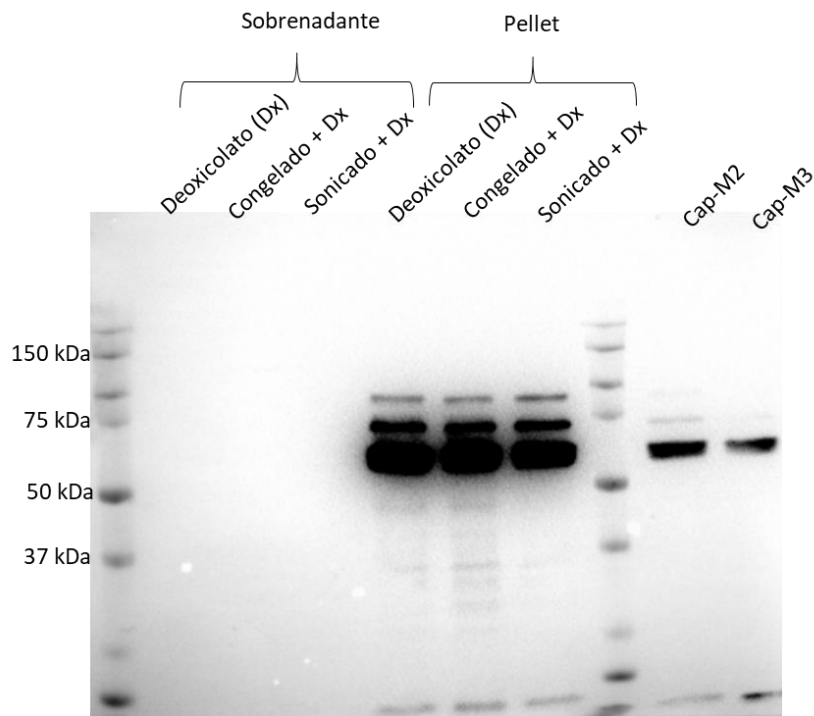
De igual forma, evaluamos el efecto del tiempo de infección en la cantidad y calidad de las VLPs, a fin de determinar el tiempo óptimo de cosecha. Se evaluó la cosecha a una viabilidad de 60 y 10%, que correspondió a 27 y 40 h.p.i. Como se observa, a diferencia de las Cap-M2, las Cap-M3 no presentaron una degradación evidente de las proteínas, aun cuando el cultivo es cosechado a una viabilidad del 10% (figura 42B). Tampoco se observó degradación de las proteínas en ausencia de inhibidores de proteasas. Además, se obtuvo mayor cantidad de proteína cuando la cosecha se realizó a tiempos más largos (40 contra 27 h.p.i.) (figura 43A y 43B), es por ello que durante la producción de los siguientes lotes de Cap-M3, la cosecha se realizó cuando la viabilidad cayó al 10%, alrededor de las 40 h.p.i.; y la extracción se llevó a cabo sin inhibidores de proteasas.



**Figura 43. A) Western blot del clarificado obtenido con las modificaciones del método de extracción, a diferentes tiempos de cosecha del cultivo. B) SDS-PAGE de las VLPs purificadas, a diferentes tiempos de cosecha del cultivo.**

Decidimos probar otros métodos de extracción de las VLPs Cap-M1. Se probaron dos de los métodos más utilizados en la literatura para la extracción de proteínas del pellet, y que han sido reportados durante la extracción de VLPs del AAV2. Éstos fueron la sonicación y la extracción con detergentes.

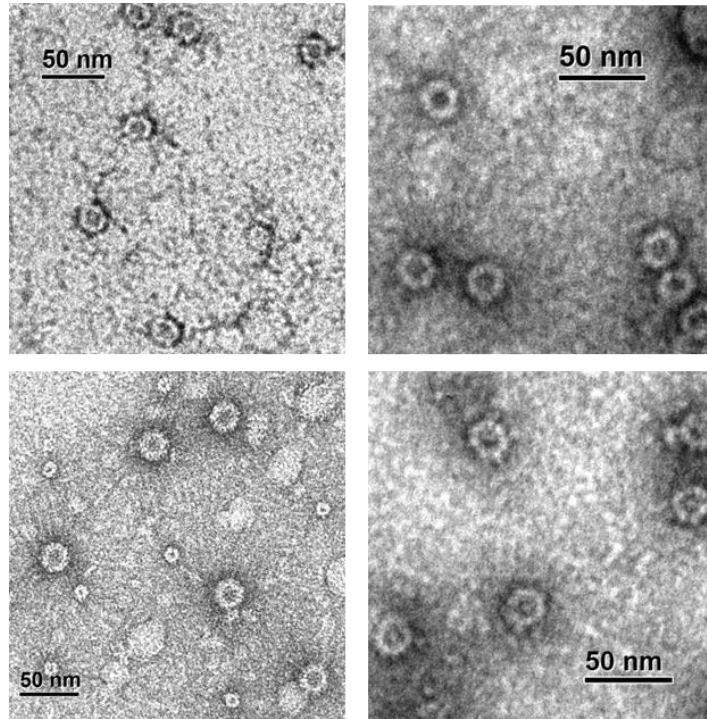
En la figura 44 se muestra el análisis por western blot de las fracciones después de la extracción de las Cap-M1 por diferentes métodos. Como se observa, el tratamiento con detergente, solo o en combinación con el sonicado o congelado y descongelado de las células, no funcionó durante los intentos de extracción de las VLPs Cap-M1. Creemos que esto puede estar relacionado con la hidrofobicidad del mimótopo 1, que fue el péptido menos soluble de los tres encontrados. Esto pudiera estar modificando la solubilidad de las cápsides del AAV2, haciendo que éstas sean más difíciles de extraer del pellet. Se continuó trabajando sólo con las VLPs Cap-M2 y Cap-M3.



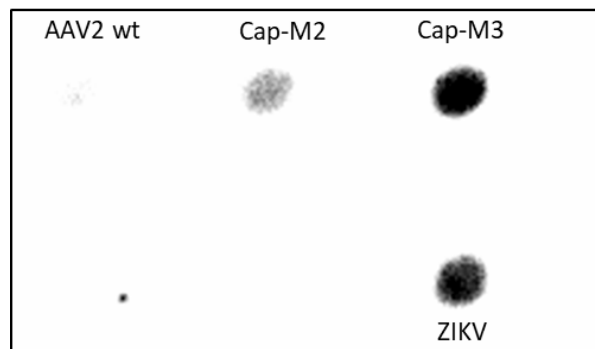
**Figura 44. Western blot de las fracciones (sobrenadante y pellet) después de la extracción de las Cap-M1 por diferentes métodos. Se incluyen las Cap-M2 y Cap-M3 después de su extracción como referencia.**

#### 6.5.2.1 Caracterización de las VLPs

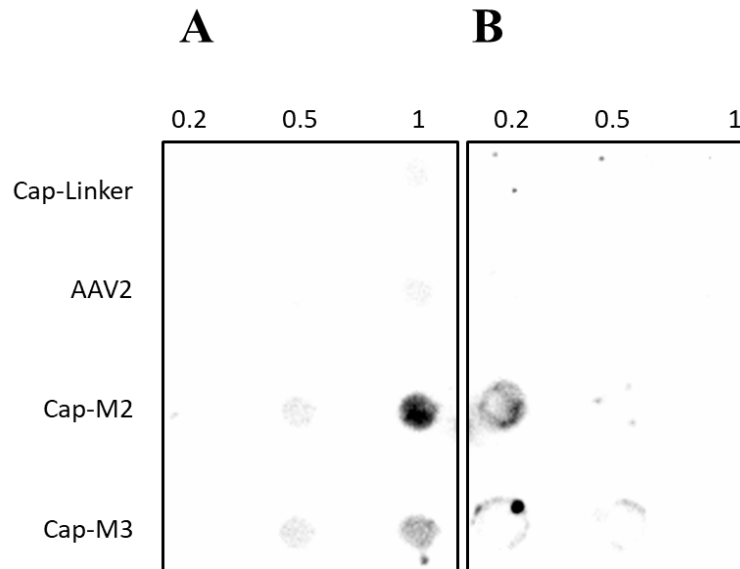
Las VLPs se analizaron por microscopía electrónica de transmisión y se corroboró que éstas se encuentran formando partículas de alrededor de 30 nm (figura 45), tal como se ha descrito para partículas pseudovirales de AAV2. Además, las cápsides modificadas con el M2 y M3 fueron reconocidas por el anticuerpo EDE1 C8, mas no las VLPs sin modificar (figura 46). Esto nos indica que los péptidos desplegados en las VLPs están conservando sus determinantes estructurales para ser reconocidos por el anticuerpo. Posteriormente, analizamos si el reconocimiento depende de la estructura de la VLP, o si el simple hecho de que los mimótopos estuvieran anclados a las proteínas era suficiente. Para ello realizamos un dot blot con las cápsides nativas o desnaturalizadas. En la figura 47 se observa que las VLPs son reconocidas únicamente, de una manera dosis-dependiente, cuando se encuentran en su estado nativo, mas no cuando están desnaturalizadas. Entonces, el despliegue de los mimótopos en el contexto de la cápside nativa es necesario para que éstos se estructuren de la manera correcta para ser reconocidos por el anticuerpo EDE1 C8 y por lo tanto para emular el epítipo EDE.



**Figura 45.** Microscopía electrónica de transmisión de las VLPs del AAV2 sin modificar (arriba, izquierda), modificadas con el linker (arriba, derecha), con el mimótopo 2 (abajo, izquierda) o con el mimótopo 3 (abajo, derecha).



**Figura 46.** Dot blot de las VLPs con el mimótopo 2 (Cap-M2), con el mimótopo 3 (Cap-M3), VLPs del virus nativo (AAV2 wt) y virus Zika inactivado (ZIKV) en presencia del anticuerpo EDE1 C8. Se cargó 1 microgramo de proteína y  $1 \times 10^4$  UFF de virus Zika después de inactivarse.



**Figura 47. Dot blot de las VLPs con el mimótopo 2 (Cap-M2), con el mimótopo 3 (Cap-M3), con un péptido control (Cap-Linker) o VLPs del virus nativo (AAV2). La figura A muestra las VLPs en estado nativo (A) y la figura B muestra las VLPs desnaturalizadas. Se cargaron 0.2, 0.5 o 1 µg de proteína.**

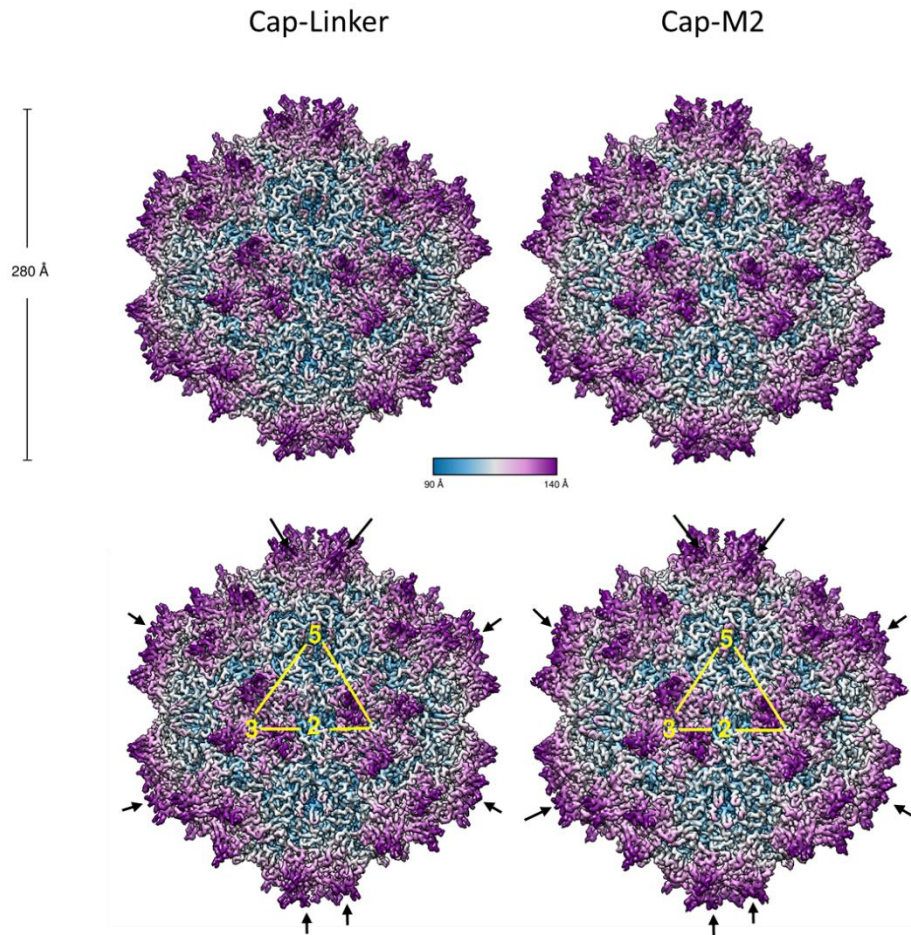
Las VLPs Cap-Linker y Cap-M2 fueron analizadas por crio-electro microscopía. Se obtuvo el mapa de densidad a una resolución de 2.21 y 2.16 Å, respectivamente. Se observó que las VLPs modificadas están ensambladas en partículas de alrededor de 30 nm que conservan la estructura icosaédrica característica del AAV2, con los ejes de simetría 2, 3 y 5 rodeando la unidad asimétrica; sin efectos de las inserciones en el ensamblaje de las partículas (figura 48). Esto concuerda con lo que se ha reportado previamente acerca de que las cápsides del AAV2 soporta la inserción de péptidos pequeños en la posición 587 (Adachi & Nakai, 2010; Girod et al., 1999).

Los mapas de densidad obtenidos se alinearon con el modelo de la cápside del AAV2 (PDB 6E9D). Se puede observar que los mapas cubren la base del loop donde se insertaron los péptidos y se observan algunas densidades extra en esa región; sin embargo, los mapas de densidad presentaron un corte justo en el sitio de inserción de los péptidos, Asn587, por lo que no se pudo resolver la estructura de los péptidos desplegados en la superficie (figura 49). Esto es indicativo de que los péptidos son sumamente flexibles y pudieran estar adoptando diferentes conformaciones. Recientemente se publicó el modelo para la cápside del AAV2 modificada en la posición 587 con un péptido de 10 aminoácidos (Bennett et al., 2020). Los autores resolvieron 6 de los 10 aminoácidos,

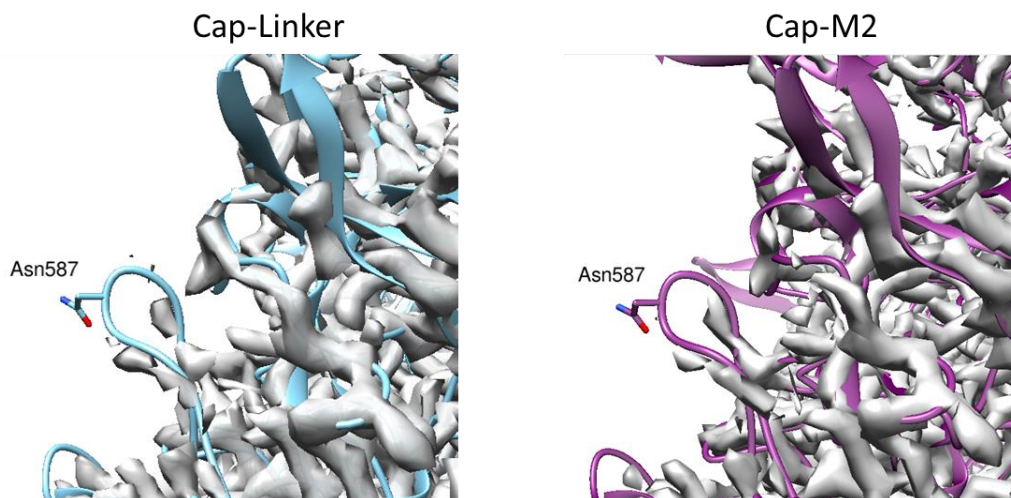
sin llegar a resolver los aminoácidos situados en la parte más superficial de la inserción. Los mimótopos insertados en este estudio están flanqueados por un espaciador de tres glicinas y tres alaninas, lo cual aporta mayor flexibilidad a las secuencias insertadas, y podría ser la causa por la cual no se logró resolver ninguno de los aminoácidos insertados. Por otra parte, existen otros estudios con otros serotipos del AAV, así como con otras partículas pseudovirales en donde tampoco se ha logrado resolver la estructura de péptidos desplegados en la superficie (Guenther et al., 2019; Zhao et al., 2020). Nuestros resultados concuerdan con dichos estudios, en donde, debido a la flexibilidad de los péptidos no ha sido posible resolver su estructura.

El alineamiento de los mapas de densidad de las cápsides Cap-M2 y Cap-Linker mostró que los mapas son muy similares; sin embargo, se observó densidad extra en la región donde se insertaron los péptidos. Esta diferencia de densidad se muestra en la figura 50, y corresponde a la diferencia en la longitud de los péptidos insertados, ya que las Cap-Linker contienen 7 aminoácidos como inserción, mientras que las Cap-M2, 24.

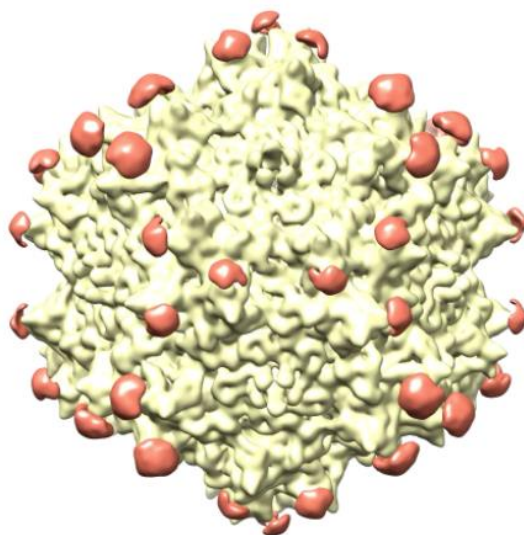
La figura 50 muestra que los mimótopos insertados en la cápside del AAV2 se despliegan en la superficie de la partícula pseudoviral y se repiten 60 veces a lo largo de la estructura, según lo esperado para la cápside del AAV2, la cual se sabe que está conformada de 60 monómeros. El arreglo repetitivo y ordenado de los mimótopos en la cápside es una característica necesaria para la correcta estimulación de las células del sistema inmune. Por otro lado, los péptidos conjugados a partículas pseudovirales son más estables e inmunogénicos en comparación con los péptidos libres. Además, el AAV2 ha demostrado ser seguro para su uso terapéutico en humanos. Estas características hacen de los mimótopos desplegados en el AAV2 buenos candidatos a vacuna contra dengue y Zika.



**Figura 48.** Mapas de densidad de las partículas Cap-Linker (izquierda) y Cap-M2 (derecha), obtenidos por crio-EM, mostrando algunos de los sitios de inserción de los mimótopos (flechas) y ejes 2, 3 y 5 de simetría rotacional. Figuras obtenidas usando el programa Chimera 1.14.



**Figura 49.** Alineamiento del modelo del AAV2 (azul o morado, PDB 6E9D) con el mapa de densidad (gris) obtenido para las partículas Cap-Linker y Cap-M2. Se muestra un acercamiento a la posición Asn587 de uno de los monómeros. Figuras obtenidas usando el programa Chimera 1.14.



**Figura 50.** Diferencia de densidad (rojo) entre la partícula Cap-Linker y Cap-M2. Figura obtenida usando el programa Chimera 1.14.

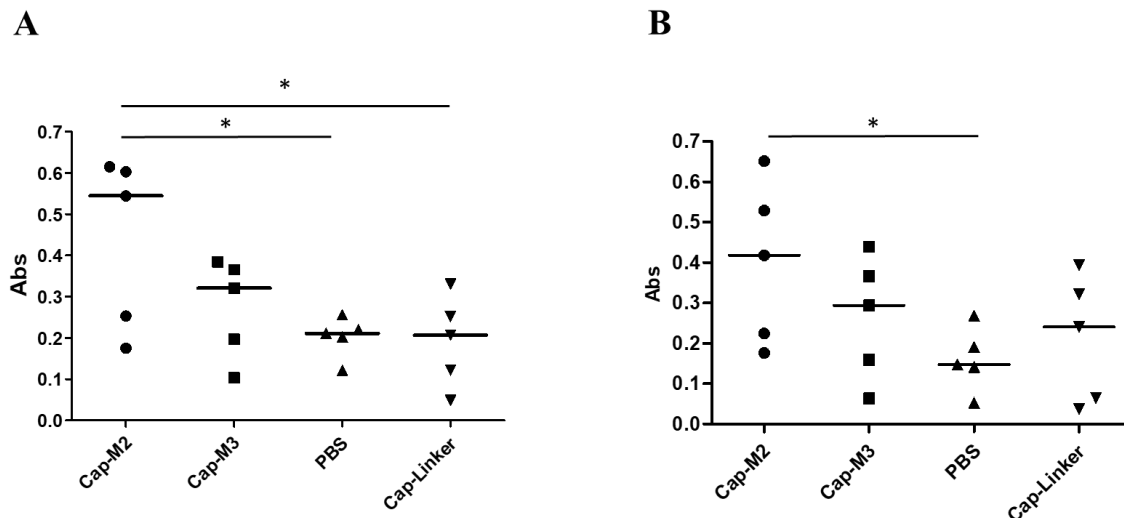


### 6.5.2.2 Inmunización y evaluación de la respuesta de anticuerpos

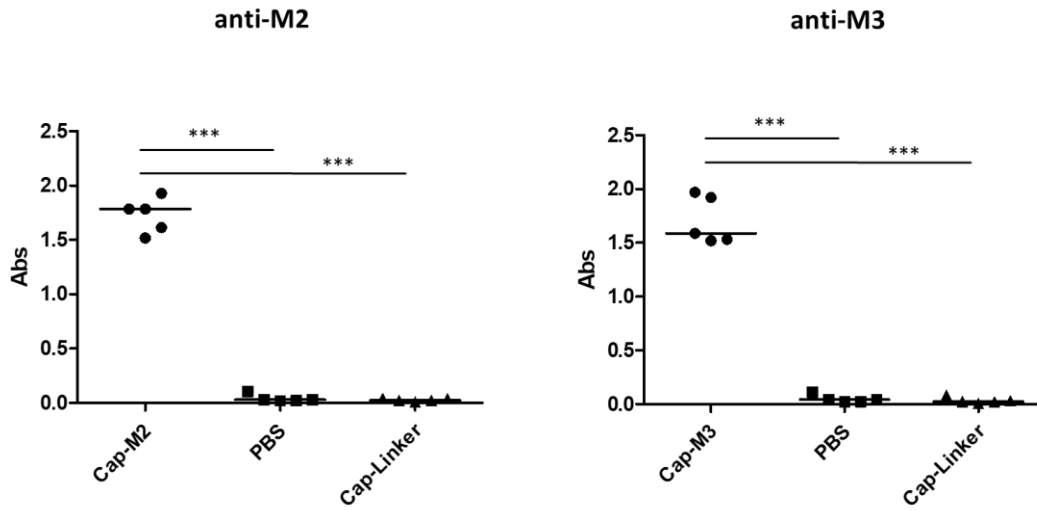
Para evaluar si los mimótopos desplegados en las VLPs inducían anticuerpos que reconocieran el epítipo natural EDE, se vacunaron ratones Balb/c. Se realizaron dos inmunizaciones vía subcutánea, usando adyuvante incompleto de Freund en la primera inmunización. Después de dos semanas de la segunda inmunización, se evaluó la capacidad del suero de los ratones para reconocer los virus Zika y dengue; sin embargo, se observó poco reconocimiento de los virus por ELISA. Se realizaron dos inmunizaciones más con el fin de aumentar el título de anticuerpos contra los mimótopos. Esta vez, en acuerdo con los lineamientos del Comité de Bioética, se inmunizó por vía intramuscular y usando alúmina como adyuvante. Después de un total de cuatro inmunizaciones, los ratones vacunados con las partículas Cap-M2 desarrollaron anticuerpos contra Zika y dengue, mas no aquéllos vacunados con las partículas Cap-M3 (figura 51). Esto nos hizo concluir que el mimótopo 2 está emulando el epítipo EDE. Además, nos permite hacer algunas especulaciones respecto a los residuos implicados en la mimetización de este sitio. De los residuos conservados entre el M2 y las proteínas E de dengue y Zika (figuras 10-12) Leu4, Glu5 y Lys6 en M2 están cambiados por fenilalanina, histidina y arginina, respectivamente, en el M3, cuando se alinean de N a C terminal ambos; o corresponden a leucina, prolina y arginina, respectivamente, cuando uno de ellos se encuentra de C a N terminal (figura 13). De estos cambios, el cambio de glutamato por histidina o por prolina, es un cambio importante, ya que en ambos casos, el aminoácido no corresponde en carga o hidrofobicidad. Por otro lado, el residuo Arg11 en M2 está cambiado por glicina en M3, cuando se analizan de N a C terminal ambos péptidos; mientras que cuando se analiza uno de C a N terminal, Arg11 y Ser12 corresponden a un ácido glutámico y una alanina, respectivamente, en M3 (figura 13). Ninguno de estos cambios es equivalente en carga o hidrofobicidad. Así, estos aminoácidos pudieran ser importantes en la mimetización del sitio EDE y esto pudiera explicar por qué los anticuerpos inducidos por el M2 reconocen dengue y Zika, mientras que los anticuerpos contra M3 no; ya que M2 mimetiza mejor el EDE que M3. Una perspectiva de este trabajo es determinar la afinidad del anticuerpo EDE1 C8 por cada mimótopo desplegado en la cápside y de esta forma poder hacer conclusiones acerca de cuál de los mimótopos es mejor emulando el EDE.

De la figura 51 también es posible concluir que el título de anticuerpos contra dengue y Zika en el grupo inmunizado con Cap-M2 es bajo, a pesar de que el título de anticuerpos contra el M2 es alto (figura 52). Esto nos indica que no todos los anticuerpos que reconocen el péptido están reconociendo el epítipo EDE en los virus dengue y Zika; es decir, que el péptido puede estar formando otros epítopos no relacionados al EDE y que después de vacunar con los mimótopos se generan anticuerpos que reconocen estos otros epítopos. Este fenómeno ha sido reportado antes para otros mimótopos y es conocido como dilución del epítipo (*epitope spreading*) (Favoino, Prete,

Catacchio, Conteduca, & Perosa, 2019). Algunas estrategias encaminadas a evitar esto consisten en usar todo el antígeno para la primera dosis de la vacuna y vacunar con el mimótopo en la segunda dosis, a fin de seleccionar aquellos anticuerpos dirigidos al epítipo de interés (Beenhouwer, May, Valadon, & Scharff, 2002). Otra opción es aplicar mutagénesis al azar en el mimótopo, a fin de encontrar variantes que favorezcan la inducción de anticuerpos únicamente contra el epítipo de interés, y que eliminen cualquier otro epítipo diferente formado por el propio péptido (Favoino et al., 2019). De igual forma, se han usado mezclas de mimótopos que conserven los aminoácidos mínimos necesarios para emular el epítipo de interés, pero que difieran en los residuos que rodean dichos aminoácidos, de esta forma se enfoca la respuesta inmune en los aminoácidos de interés (Favoino et al., 2017). Finalmente, cabe resaltar que los resultados obtenidos constituyen una prueba de concepto de que es posible diseñar un candidato a vacuna basado en el epítipo EDE y se requieren más estudios sobre la respuesta inmune generada por estos candidatos, como el determinar la capacidad neutralizante de los anticuerpos generados y su capacidad para evitar la AMA.



**Figura 51. Detección de anticuerpos contra ZIKV (A) y DENV (B) por ELISA. Se reporta la absorbancia de la dilución 1:50.**



**Figura 52. Detección de anticuerpos contra los mimótopos en su forma de péptidos libres por ELISA. Se reporta la absorbancia de los sueros diluidos 1:200, para cada grupo evaluado.**

## VII. CONCLUSIONES

En el presente trabajo se descubrieron tres secuencias de péptidos que se unen al anticuerpo EDE1 C8. Las secuencias descubiertas no corresponden a ninguna secuencia lineal de la proteína E, sino que son péptidos nuevos. Demostramos que los péptidos desplegados en el bacteriófago no son capaces de inducir una respuesta inmune, debido al bajo número de copias de péptido presente por partícula, la respuesta de anticuerpos se desvía hacia las proteínas del fago. De igual forma, encontramos que los péptidos de forma libre pierden sus determinantes estructurales y su capacidad de unir al anticuerpo EDE1 C8.

Dentro de nuestra búsqueda de un sistema de despliegue que conservara las características estructurales de los péptidos, observamos que la conjugación química afectó la estructura de los péptidos. Los péptidos conjugados a las proteínas VP6 y BSA no fueron reconocidos por el anticuerpo. Al ser un método que conjuga de forma indiscriminada los grupos amino y carboxilo de las proteínas presentes, no fue apropiado para conservar un plegamiento adecuado de los péptidos.

El sistema de despliegue en partículas pseudovirales del virus adeno-asociado fue el más apropiado para el despliegue de estos péptidos. Al ser un método que conjuga exclusivamente los extremos N y C terminal de los péptidos desplegados, éstos pueden plegarse de forma apropiada, de tal forma que los péptidos desplegados en las VLPs fueron reconocidos por el anticuerpo. Observamos que la presencia de los péptidos en condiciones desnaturalizantes no es suficiente para el reconocimiento por el anticuerpo, sino que es necesario que los péptidos se desplieguen en el contexto de la cápside nativa, lo que corrobora que los péptidos deben adquirir una conformación específica necesaria para el reconocimiento por el anticuerpo.

Los péptidos desplegados en las VLPs se encuentran desplegados en la superficie, con un arreglo repetitivo y ordenado, algo que es clave para la correcta estimulación de las células del sistema inmune (Hinton, Jegerlehner, & Bachmann, 2008); además, poseen bastante flexibilidad, según lo observado por crio-EM. Durante estos análisis también observamos que las VLPs que modificamos con los péptidos conservan el estado particulado y la simetría icosaédrica.

Durante este trabajo de investigación también se aportó al conocimiento sobre la producción de estas partículas pseudovirales en cultivo celular. Detectamos que las partículas pseudovirales modificadas son más tóxicas para las células de insecto SF9, comparadas con las partículas pseudovirales sin modificar. Esto hace que los cultivos disminuyan drásticamente su viabilidad tan sólo 24 horas post infección, aún a bajas multiplicidades de infección. También concluimos que la

modificación de la secuencia de las proteínas que forman la cápside del AAV2 puede tener repercusiones en características como su solubilidad y estabilidad. Las VLPs modificadas con el péptido 2 fueron más propensas a la degradación por proteasas; mientras que las VLPs modificadas con el péptido 1 se volvieron más hidrofóbicas.

La inmunización con las VLPs modificadas indujo anticuerpos contra el péptido desplegado, ya fuera el péptido 2 o 3. Sin embargo, sólo la inmunización con las VLPs que despliegan el péptido 2 indujo anticuerpos que reconocen los virus dengue y Zika. La respuesta de anticuerpos contra dengue y Zika fue menor que la respuesta de anticuerpos contra el péptido; por lo que concluimos que, al igual que otros mimótopos reportados en la literatura, el mimótomo 2 posee otros epítomos, además del epítomo EDE, hacia los cuales también hay una respuesta de anticuerpos. También podemos concluir que, entre el péptido 2 y 3, sólo el péptido 2 es un mimótomo por definición; ya que mimetiza el epítomo EDE de tal forma que une un anticuerpo dirigido a este epítomo y; además, induce anticuerpos que reconocen el antígeno donde se encuentra este epítomo; es decir, los virus dengue y Zika.

Las diferencias observadas entre los mimótopos nos sugieren que la secuencia del péptido 2 contiene elementos clave para emular el epítomo EDE, a diferencia del péptido 3. Así, mediante alineamientos hechos con los mimótopos y las secuencias de las proteínas E de dengue y Zika, encontramos que sólo el mimótomo 2, mas no el 1 o el 3, conserva similitud con la proteína E de ambos virus. Los alineamientos mostraron que el péptido 2 posee aminoácidos específicos, ordenados de una forma tal, que simulan dos posiciones en la proteína E de dengue y Zika importantes para la unión del anticuerpo EDE1 C8. Estos aminoácidos están cambiados en los mimótopos 1 y 3. Además, el mimótomo 2 fue el que más veces se encontró representado en las placas de fagos secuenciadas.

Con la evidencia recabada concluimos que durante este trabajo de investigación se aportó información relevante respecto a la emulación del epítomo EDE, siendo éste el primer trabajo relacionado con su aislamiento fuera de la proteína E para el desarrollo de una vacuna dual contra dengue y Zika. Mediante la obtención de los mimótopos aquí reportados, se obtuvo una prueba de concepto de que esto es posible y se sentaron las bases para el diseño de nuevos mimótopos mejorados. Además, se avanzó en el desarrollo de una plataforma para el despliegue de éstos mimótopos o de otros epítomos, que pudiera servir como candidato a vacuna contra otros patógenos.

## VIII. PERSPECTIVAS

- Mejorar los mimótopos para aumentar el título de anticuerpos contra dengue y Zika.
- Estudiar la capacidad neutralizante, así como el efecto AMA, de los anticuerpos inducidos con la inmunización del candidato a vacuna.
- Evaluar la protección contra la infección por dengue y Zika en un modelo animal.
- Evaluar la respuesta inmune con el uso de un adyuvante aprobado para uso en humanos.
- Evaluar el efecto de la respuesta inmune previa contra el vector.

## IX. ANEXOS

### ANEXO 1: SECUENCIA COMPLETA DEL ANTICUERPO EDE1 C8 PRODUCIDO

a) Cadena pesada

Péptido señal

Región variable

Región constante

Mutación

Mutación

AvrII / Kozak / INICIO / PARO / BstZ17I

Secuencia de la proteína:

MEFGLSWVFLVAILKGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGFTFSTYSMHWVRQAP  
GKGLEYSVAITGEGDSAFYADSVKGRFTISRDNKNTLYFEMNSLRPEDTAVYYCVGGYSN  
FYYYTMDVWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS  
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVKDKRVEPK  
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV  
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA  
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS  
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSL<sup>R</sup>PG\*

Secuencia de nucleótidos:

CCTAGG GCCACC ATG GAGTTCGGCCTGTCCTGGGTGTTCTGGTGGCTATTCTGAAGG  
GCGTGCAGTGCGAGGTGCAGCTGGTTGAATCTGGCGGAGGATTGGTTCAGCCTGGCGG  
CTCTCTGAGACTGTCCTGTTCTGCCTCTGGCTTCACCTTCTCCACCTACTCCATGCACTG  
GGTCCGACAGGCCCTGGCAAAGGCCTGGAATATGTGTCTGCTATCACCGGCGAGGGC  
GACTCTGCCTTCTACGCCGATTCTGTGAAGGGCAGATTCACCATCAGCCGGGACAACCTC  
CAAGAACACCCTGTACTTCGAGATGAACTCCCTGCGGCCTGAGGACACCGCCGTGTAT  
TATTGTGTCGGCGGCTACTCCAACCTTTACTACTACTACACCATGGACGTGTGGGGCCA  
GGGCACCACCGTTACAGTTTCTTCCGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTCCCTCTGG  
CCCCAGCAGCAAGAGCACACGCGGCGGAACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGG  
ACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGTGTCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGAGT  
GCACACCTTCCCTGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACTCCCTGAGCAGCGTGGTG  
ACCGTGCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGC  
CCTCCAACACCAAGGTGGACAAG AGG GTGGAGCCTAAGAGCTGCGACAAGACCCACA  
CCTGCCCTCCCTGCCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCCAGCGTGTTCCTGTTCCCT

CCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGG  
 TGGACGTGAGCCACGAGGACCCCGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA  
 GGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTCGGGAGGAGCAGTACAACCTCCACCTACCGCGTG  
 GTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA  
 AGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCGCTCCCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGG  
 GCCAGCCCCGGGAGCCTCAGGTGTACACCCTGCCCCAGCCGCGACGAGCTGACCAA  
 GAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGTG  
 GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCTGAGAACAACACTACAAGACCACCCCTCCCGTGCTGG  
 ACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCCGGTGGCA  
 GCAGGGCAACGTGTTTACGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACC  
 CAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCCCGGA**TAG**GTATAC

Notas:

La región sombreada en cian representa un aminoácido diferente de la secuencia consenso reportada para la IgG1 humana. El cambio se mantuvo según lo reportado por Rouvinski et al. (2015).

La región sombreada en magenta es una mutación que cambió el aminoácido de serina a arginina, encontrada después de propagar el plásmido en bacteria.

b) Cadena ligera

Péptido señal

Region variable

Región constante

EcoRV / Kozak / INICIO / PARO / PacI

Secuencia de la proteína:

MDMRVPAQLLGLLLWLSGARCEIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISTFLAWYQHK  
 PGQAPRLLIYDASTRATGVPARFSGSRSGTDFTLTISTLEPEDFAVYYCQQRYNWPPYTFGQ  
 GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNALQSGNSQE  
 SVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC\*

Secuencia de nucleótidos:

GATATCGCCACCATCGACATGAGAGTGCCCGCTCAGCTGCTGGGACTGCTGCTGTTGT  
 GTTTGTCCGGCGCCAGATGCGAGATCGTGCTGACTCAGTCCCCTGCCACACTGTCACTG  
 TCTCCAGGCGAGAGAGCTACCCTGTCCTGTAGAGCCAGCCAGTCTATCTCCACCTTCT  
 GGCCTGGTATCAGCACAAAGCCTGGACAGGCTCCCGGCTGCTGATCTACGATGCTTCTA  
 CCAGAGCTACCGGCGTGCCCGCCAGATTCTCTGGCTCTAGATCTGGCACCGACTTCACC



CTGACCATCAGCACCTGGAACCTGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCGGT  
ACAACCTGGCCTCCTTACACCTTTGGCCAGGGCACCAAGGTGGAAATCAAGCGGACCGT  
GGCCGCCCCCAGCGTGTTTCATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCG  
CCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAA  
GGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACTC  
CAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAG  
AAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCA  
AGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGC **TAGTTAATTAA**

Notas:

Se eliminaron dos residuos (R y S) reportados por Rouvinski et al. (2015) al inicio de la cadena ligera, para hacer coincidir la secuencia con la secuencia consenso. Estos residuos probablemente pertenecían al péptido señal original de la cadena ligera.

## ANEXO 2. LISTA DE PUBLICACIONES

Derivado de este trabajo de investigación se publicó el artículo siguiente:

- Cuevas-Juárez, E., Liñan-Torres, A., Hernández, C., Kopylov, M., Potter, C. S., Carragher, B., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2023). Mimotope discovery as a tool to design a vaccine against Zika and dengue viruses. *Biotechnology and Bioengineering*, 1– 14. <https://doi.org/10.1002/bit.28392>

Se publicó el siguiente artículo de revisión que fungió como mi actividad académica:

- Cuevas-Juárez E, Pando-Robles V, Palomares LA. Flavivirus vaccines: Virus-like particles and single-round infectious particles as promising alternatives. *Vaccine*. 2021 Nov 26;39(48):6990-7000. doi: 10.1016/j.vaccine.2021.10.049. Epub 2021 Nov 6. PMID: 34753613.

El siguiente artículo fue resultado de una colaboración dentro del grupo:

- Alcalá AC, Contreras MA, Cuevas-Juárez E, Ramírez OT, Palomares LA. Effect of sericin, a silk derived protein, on the amplification of Zika virus in insect and mammalian cell cultures. *J Biotechnol*. 2022 Jul 20;353:28-35. doi: 10.1016/j.jbiotec.2022.05.005. Epub 2022 May 25. PMID: 35623476.

Se publicaron dos artículos de divulgación:

- Alcalá-Aristiguieta, A.C., Cuevas-Juárez, E. (2020). Innovación: vacunas contra el dengue y Zika. ¿Que hay y hacia dónde van?. *Biotecnología en Movimiento. Revista de divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM*, 20, 16-19.
- Palomares, L.A., Cuevas-Juárez, E., López-Macias, C. (2019). Influencia, retos y la importancia de vacunar. *Biotecnología en Movimiento. Revista de divulgación del Instituto de Biotecnología de la UNAM*, 19, 23-27.

El siguiente capítulo de libro:

- Castro-Peralta, F., Cuevas-Juárez, E., Palomares, L. A. (2017). La virología en la industria farmacéutica. *La Virología en México Situación Actual, Retos y Oportunidades*. 145-157, México.

Se redactó una patente que está siendo revisada para someterse.

## X. REFERENCIAS

- Adachi, K., & Nakai, H. (2010). A new recombinant Adeno-associated virus (AAV)-based random peptide display library system: infection-defective AAV1.9-3 as a novel detargeted platform for vector evolution. *Gene Therapy and Regulation*, 5(1), 31–55. <https://doi.org/10.1142/S1568558610000197>
- Amin, N., Pupo, M., Aguilar, A., Camacho, F., Alvarez, M., Caballero, Y., ... Acosta, A. (2013). Immunogenicity of NS4b Dengue 3 Virus Mimotope Presented to the Immune System as Multiple Antigen Peptide System. *ISRN Virology*, 2013, 924057. <https://doi.org/10.5402/2013/924057>
- Bakshi, K., Liyanage, M. R., Volkin, D. B., & Middaugh, C. R. (2014). Circular Dichroism of Peptides. In A. E. Nixon (Ed.), *Therapeutic Peptides: Methods and Protocols* (pp. 247–253). [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-673-3\\_17](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-673-3_17)
- Barba-Spaeth, G., Dejnirattisai, W., Rouvinski, A., Vaney, M.-C., Medits, I., Sharma, A., ... Rey, F. A. (2016). Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*, 539(7628), 314–314. <https://doi.org/10.1038/nature19780>
- Beenhouwer, D. O., May, R. J., Valadon, P., & Scharff, M. D. (2002). High Affinity Mimotope of the Polysaccharide Capsule of *Cryptococcus neoformans*; Identified from an Evolutionary Phage Peptide Library. *The Journal of Immunology*, 169(12), 6992 LP – 6999. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.12.6992>
- Bennett, A., Keravala, A., Makal, V., Kurian, J., Belbellaa, B., Acran, R., ... Agbandje-McKenna, M. (2020). Structure comparison of the chimeric AAV2.7m8 vector with parental AAV2. *Journal of Structural Biology*, 209(2), 107433. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2019.107433>
- Biswal, S., Borja-Tabora, C., Martinez Vargas, L., Velásquez, H., Theresa Alera, M., Sierra, V., ... Wallace, D. (2020). Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4-16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 395(10234), 1423–1433. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30414-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30414-1)
- Biswal, S., Reynales, H., Saez-Llorens, X., Lopez, P., Borja-Tabora, C., Kosalaraksa, P., ... Wallace, D. (2019). Efficacy of a Tetravalent Dengue Vaccine in Healthy Children and Adolescents. *New England Journal of Medicine*, 381(21), 2009–2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1903869>
- Brault, A. C., Domi, A., McDonald, E. M., Talmi-Frank, D., McCurley, N., Basu, R., ... Guirakhoo, F. (2017). A Zika Vaccine Targeting NS1 Protein Protects Immunocompetent Adult Mice in a Lethal Challenge Model. *Scientific Reports*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15039-8>
- Breitbach, M. E., Newman, C. M., Dudley, D. M., Stewart, L. M., Aliota, M. T., Koenig, M. R., ... O'Connor, D. H. (2019). Primary infection with dengue or Zika virus does not affect the severity of heterologous secondary infection in macaques. *PLoS Pathogens*, 15(8), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007766>
- Buhrman, J. D., Jordan, K. R., Munson, D. J., Moore, B. L., Kappler, J. W., & Slansky, J. E. (2013). Improving antigenic peptide vaccines for cancer immunotherapy using a dominant tumor-specific T cell receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(46), 33213–33225. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.509554>
- Chahal, P. S., Aucoin, M. G., & Kamen, A. (2007). Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *Journal of Virological Methods*, 139(1), 61–70. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2006.09.011>
- Costa, V. V., Fagundes, C. T., Valadão, D. F., Ávila, T. V., Cisalpino, D., Rocha, R. F., ... Souza, D. G. (2014). Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. *Medical Microbiology and Immunology*, 203(4), 231–250. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0334-5>
- Crill, W. D., & Roehrig, J. T. (2001). Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *Journal of Virology*, 75(16), 7769–7773. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001>
- Cruz-Gatell, M. (2003). *Diseño, síntesis y evaluación de inhibidores de la proteína beta-amiloide. Desarrollo de un modelo de fibrilogénesis*. Universidad de Barcelona.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A. R. B., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews*,

- 39(2), 155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- Cuevas-Juárez, E., Liñan-Torres, A., Hernández, C., Kopylov, M., Potter, C. S., Carragher, B., ... Palomares, L. A. (2023). Mimotope discovery as a tool to design a vaccine against Zika and dengue viruses. *Biotechnology and Bioengineering*, *n/a*(*n/a*). <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/bit.28392>
- de Araújo, T. V. B., Ximenes, R. A. de A., Miranda-Filho, D. de B., Souza, W. V., Montarroyos, U. R., de Melo, A. P. L., ... Felix Oliveira, V. (2018). Association between microcephaly, Zika virus infection, and other risk factors in Brazil: final report of a case-control study. *The Lancet Infectious Diseases*, *18*(3), 328–336. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30727-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30727-2)
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirisakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., ... Screaton, G. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5979), 745–748. <https://doi.org/10.1126/science.1185181>
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., Duangchinda, T., ... Screaton, G. R. (2016). Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nature Immunology*, *17*(9), 1102–1108. <https://doi.org/10.1038/ni.3515>
- Dejnirattisai, W., Wongwiwat, W., Supasa, S., Zhang, X., Dai, X., Rouvinsky, A., ... Screaton, G. R. (2014). A new class of highly potent, broadly neutralizing antibodies isolated from viremic patients infected with dengue virus. *Nature Immunology*, *16*(2), 170–177. <https://doi.org/10.1038/ni.3058>
- Delmastro, P., Meola, A., Monaci, P., Cortese, R., & Galfrè, G. (1997). Immunogenicity of filamentous phage displaying peptide mimotopes after oral administration. *Vaccine*, *15*(11), 1276–1285. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(97\)00072-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0264-410X(97)00072-8)
- Deng, S. Q., Yang, X., Wei, Y., Chen, J. T., Wang, X. J., & Peng, H. J. (2020). A review on dengue vaccine development. *Vaccines*, *8*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010063>
- DGE. (2020a). Casos Confirmados de Infección por Virus Zika 2020. Retrieved April 2, 2020, from <https://www.gob.mx/salud/documentos/casos-confirmados-de-infeccion-por-virus-zika-2020>
- DGE. (2020b). Panorama Epidemiológico de Dengue 2019. Retrieved April 2, 2020, from <https://www.gob.mx/salud/documentos/panorama-epidemiologico-de-dengue-2019>
- Diamond, M. S., Ledgerwood, J. E., & Pierson, T. C. (2019). Zika Virus Vaccine Development: Progress in the Face of New Challenges. *Annual Review of Medicine*, *70*(1), 121–135. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-040717-051127>
- Dowd, K. A., DeMaso, C. R., Pelc, R. S., Speer, S. D., Smith, A. R. Y., Goo, L., ... Pierson, T. C. (2016). Broadly Neutralizing Activity of Zika Virus-Immune Sera Identifies a Single Viral Serotype. *Cell Reports*, *16*(6), 1485–1491. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.049>
- Favoino, E., Prete, M., Catacchio, G., Conteduca, G., & Perosa, F. (2019). CD20-mimotope peptides: A model to define the molecular basis of epitope spreading. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20081920>
- Favoino, E., Prete, M., Marzullo, A., Millo, E., Shoenfeld, Y., & Perosa, F. (2017). CD20-Mimotope Peptide Active Immunotherapy in Systemic Lupus Erythematosus and a Reappraisal of Vaccination Strategies in Rheumatic Diseases. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, *52*(2), 217–233. <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8551-x>
- Felici, F., Luzzago, A., Folgori, A., & Cortese, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, II. Selection of clones recognized by a protective monoclonal antibody against the Bordetella pertussis toxin from phage peptide libraries. *Gene*, *128*(1), 21–27. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90148-V](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90148-V)
- Fernandez, E., Dejnirattisai, W., Cao, B., Scheaffer, S. M., Supasa, P., Wongwiwat, W., ... Diamond, M. S. (2017). Human antibodies to the dengue virus E-dimer epitope have therapeutic activity against Zika virus infection. *Nature Immunology*, *18*(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1038/ni.3849>
- Flasche, S., Jit, M., Rodríguez-Barraquer, I., Coudeville, L., Recker, M., Koelle, K., ... Ferguson, N. (2016). The Long-Term Safety, Public Health Impact, and Cost-Effectiveness of Routine Vaccination with a Recombinant, Live-Attenuated Dengue Vaccine (Dengvaxia): A Model Comparison Study. *PLoS Medicine*, *13*(11), e1002181–e1002181. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1002181>
- Fowler, A. M., Tang, W. W., Young, M. P., Mamidi, A., Viramontes, K. M., McCauley, M. D., ... Shresta, S. (2018). Maternally Acquired Zika Antibodies Enhance Dengue Disease Severity in Mice. *Cell Host and Microbe*, *24*(5), 743-750.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.09.015>
- Ganglberger, E., Grunberger, K., Guntaka, R. V., Sponer, B., Breiteneder, H., Boltz-Nitulescu, G., ...

- Jensenjarolim, E. (2000). Allergen mimotopes for 3-dimensional epitope search and induction of antibodies inhibiting human IgE. *The FASEB Journal*, *14*(14), 2177–2184. <https://doi.org/10.1096/fj.99-1000com>
- George, J., Valiant, W. G., Mattapallil, M. J., Walker, M., Huang, Y. J. S., Vanlandingham, D. L., ... Mattapallil, J. J. (2017). Prior Exposure to Zika Virus Significantly Enhances Peak Dengue-2 Viremia in Rhesus Macaques. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10901-1>
- Girod, A., Ried, M., Wobus, C., Lahm, H., Leike, K., Kleinschmidt, J., ... Hallek, M. (1999). Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2. *Nature Medicine*, *5*(9), 1052–1056. <https://doi.org/10.1038/12491>
- Guenther, C. M., Brun, M. J., Bennett, A. D., Ho, M. L., Chen, W., Zhu, B., ... Suh, J. (2019). Protease-Activatable Adeno-Associated Virus Vector for Gene Delivery to Damaged Heart Tissue. *Molecular Therapy*, *27*(3), 611–622. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2019.01.015>
- Guy, B., & Jackson, N. (2016). Dengue vaccine: hypotheses to understand CYD-TDV-induced protection. *Nature Reviews Microbiology*, *14*(1), 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2015.2>
- Haby, M. M., Pinart, M., Elias, V., & Reveiz, L. (2018). Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. *Bulletin of the World Health Organization*, *96*(6), 402–413D. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.201541>
- Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., ... Saville, M. (2015). Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *New England Journal of Medicine*, *373*(13), 1195–1206. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1506223>
- Haryadi, R., Ho, S., Kok, Y. J., Pu, H. X., Zheng, L., Pereira, N. A., ... Song, Z. (2015). Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS ONE*, *10*(2), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>
- Heinz, F.X., & Stiasny, K. (2018). Proteolytic Activation of Flavivirus Envelope Proteins. In E. Böttcher-Friebertshäuser, W. Garten, & H. Klenk (Eds.), *Activation of Viruses by Host Proteases* (pp. 109–132). Springer, Cham.
- Heinz, Franz X, & Stiasny, K. (2017). The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *81*(1), e00055-16. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00055-16>
- Hinton, H. J., Jegerlehner, A., & Bachmann, M. F. (2008). *Pattern Recognition by B Cells: The Role of Antigen Repetitiveness Versus Toll-Like Receptors* BT - *Specialization and Complementation of Humoral Immune Responses to Infection* (T. Manser, Ed.). [https://doi.org/10.1007/978-3-540-73900-5\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-540-73900-5_1)
- Humbert, M., Antoni, S., Brill, B., Landersz, M., Rodes, B., Soriano, V., ... Dietrich, U. (2007). Mimotopes selected with antibodies from HIV-1-neutralizing long-term non-progressor plasma. *European Journal of Immunology*, *37*(2), 501–515. <https://doi.org/10.1002/eji.200636560>
- Jagu, S., Karanam, B., Wang, J. W., Zayed, H., Weghofer, M., Brendle, S. A., ... Christensen, N. D. (2015). Durable immunity to oncogenic human papillomaviruses elicited by adjuvanted recombinant Adeno-associated virus-like particle immunogen displaying L2 17-36 epitopes. *Vaccine*, *33*(42), 5553–5563. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.09.005>
- Karpenko, L. I., Scherbakova, N. S., Chikaev, A. N., Tumanova, O. Y., Lebedev, L. R., Shalamova, L. A., ... Ilyichev, A. A. (2012). Polyepitope protein incorporated the HIV-1 mimotope recognized by monoclonal antibody 2G12. *Molecular Immunology*, *50*(4), 193–199. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molimm.2012.01.003>
- Katzelnick, L.C., Narvaez, C., Arguello, S., Lopez Mercado, B., Collado, D., Ampie, O., ... Harris, E. (2020). Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science (New York, N.Y.)*, *In press*(August), 1123–1128.
- Katzelnick, Leah C, Gresh, L., Halloran, M. E., Mercado, J. C., Kuan, G., Gordon, A., ... Harris, E. (2017). Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, *358*(6365), 929 LP – 932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Khandia, R., Munjal, A., Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Malik, Y. S., ... Chaicumpa, W. (2018). Modulation of Dengue/Zika Virus pathogenicity by antibody-dependent enhancement and strategies to protect against enhancement in Zika Virus infection. *Frontiers in Immunology*, *9*(APR).

- <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00597>
- Kim, S. J., & Lee, G. M. (1999). Cytogenetic Analysis of Chimeric Antibody-Producing CHO Cells in the Course of Dihydrofolate Reductase-Mediated Gene Amplification and Their Stability in the Absence of Selective Pressure. *Biotechnology and Bioengineering*, *64*(6), 741–749.
- Konishi, E., & Mason, P. W. (1993). Proper maturation of the Japanese encephalitis virus envelope glycoprotein requires cosynthesis with the premembrane protein. *Journal of Virology*, *67*(3), 1672–1675. Retrieved from <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8437237>
- Kuhn, R. J., Dowd, K. A., Beth Post, C., & Pierson, T. C. (2015). Shake, rattle, and roll: Impact of the dynamics of flavivirus particles on their interactions with the host. *Virology*, *479–480*, 508–517. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.03.025>
- Leung, N. Y. H., Wai, C. Y. Y., Ho, M. H. K., Liu, R., Lam, K. S., Wang, J. J., ... Leung, P. S. C. (2017). Screening and identification of mimotopes of the major shrimp allergen tropomyosin using one-bead-one-compound peptide libraries. *Cellular & Molecular Immunology*, *14*(3), 308–318. <https://doi.org/10.1038/cmi.2015.83>
- Li, C., Xu, D., Ye, Q., Hong, S., Jiang, Y., Liu, X., ... Xu, Z. (2016). Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell*, *19*(1), 120–126. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>
- López-Camacho, C., Abbink, P., Larocca, R. A., Dejnirattisai, W., Boyd, M., Badamchi-Zadeh, A., ... Reyes-Sandoval, A. (2018). Rational Zika vaccine design via the modulation of antigen membrane anchors in chimpanzee adenoviral vectors. *Nature Communications*, *9*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04859-5>
- Luzzago, A., Felici, F., Tramontano, A., Pessi, A., & Cortese, R. (1993). Mimicking of discontinuous epitopes by phage-displayed peptides, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptides. *Gene*, *128*(1), 51–57. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119\(93\)90152-S](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0378-1119(93)90152-S)
- Malkki, H. (2016). Zika virus infection could trigger Guillain–Barré syndrome. *Nature Reviews Neurology*, *12*(4), 187. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2016.30>
- Manzano-Szalai, K., Thell, K., Willensdorfer, A., Weghofer, M., Pfanzagl, B., Singer, J., ... Jensen-Jarolim, E. (2014). Adeno-associated virus-like particles as new carriers for B-cell vaccines: Testing immunogenicity and safety in BALB/c mice. *Viral Immunology*, *27*(9), 1–11. <https://doi.org/10.1089/vim.2014.0059>
- McCracken, M. K., Gromowski, G. D., Friberg, H. L., Lin, X., Abbink, P., De La Barrera, R., ... Thomas, S. J. (2017). Impact of prior flavivirus immunity on Zika virus infection in rhesus macaques. *PLOS Pathogens*, *13*(8), e1006487. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006487>
- Medina, F. A., Torres, G., Acevedo, J., Fonseca, S., Casiano, L., De León-Rodríguez, C. M., ... Muñoz-Jordán, J. L. (2018). Duration of the Presence of Infectious Zika Virus in Semen and Serum. *The Journal of Infectious Diseases*, *219*(1), 31–40. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy462>
- Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., ... Galfrè, G. (1995). Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage. *The Journal of Immunology*, *154*(7), 3162 LP – 3172. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/154/7/3162.abstract>
- Messina, J. P., Brady, O. J., Golding, N., Kraemer, M. U. G., Wint, G. R. W., Ray, S. E., ... Hay, S. I. (2019). The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nature Microbiology*, *4*(9), 1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>
- Mota, J., Acosta, M., Argotte, R., Figueroa, R., Méndez, A., & Ramos, C. (2005). Induction of protective antibodies against dengue virus by tetravalent DNA immunization of mice with domain III of the envelope protein. *Vaccine*, *23*(26), 3469–3476. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2004.12.028>
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, *3*(1), 13–22. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1067>
- Nieto, K., Weghofer, M., Sehr, P., Ritter, M., Sedlmeier, S., Karanam, B., ... Kleinschmidt, J. A. (2012). Development of AAVLP(HPV16/31L2) particles as broadly protective HPV vaccine candidate. *PLOS ONE*, *7*(6), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039741>
- O'Rourke, J. P., Daly, S. M., Triplett, K. D., Peabody, D., Chackerian, B., & Hall, P. R. (2014). Development of a Mimotope Vaccine Targeting the Staphylococcus aureus Quorum Sensing Pathway. *PLOS ONE*,

- 9(11), e111198. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111198>
- OPS. (2018). Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas 2015-2018 cumulative cases. Retrieved January 17, 2020, from [https://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=es](https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=12390:zika-cumulative-cases&Itemid=42090&lang=es)
- Pantoja, P., Pérez-Guzmán, E. X., Rodríguez, I. V., White, L. J., González, O., Serrano, C., ... Sariol, C. A. (2017). Zika virus pathogenesis in rhesus macaques is unaffected by pre-existing immunity to dengue virus. *Nature Communications*, 8(1), 15674. <https://doi.org/10.1038/ncomms15674>
- Pastor, A. R., Rodríguez-Limas, W. A., Contreras, M. A., Esquivel, E., Esquivel-Guadarrama, F., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). The assembly conformation of rotavirus VP6 determines its protective efficacy against rotavirus challenge in mice. *Vaccine*, 32(24), 2874–2877. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.02.018>
- Pérez-Escoda, M. T. (2007). *Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)*. Universidad de Barcelona.
- Plascencia-Villa, G., Mena, J. A., Castro-Acosta, R. M., Fabián, J. C., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2011). Strategies for the purification and characterization of protein scaffolds for the production of hybrid nanobiomaterials. *Journal of Chromatography B*, 879(15–16), 1105–1111. <https://doi.org/10.1016/J.JCHROMB.2011.03.027>
- Rathore, A. P. S., Saron, W. A. A., Lim, T., Jahan, N., & John, A. L. S. (2019). *Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus – induced microcephaly in fetuses*. (February), 1–11.
- Rey, F. A., Stiasny, K., Vaney, M.-C., Dellarole, M., & Heinz, F. X. (2018). The bright and the dark side of human antibody responses to flaviviruses: lessons for vaccine design. *EMBO Reports*, 19(2), 206–224. <https://doi.org/10.15252/embr.201745302>
- Richner, J. M., Himansu, S., Dowd, K. A., Butler, S. L., Salazar, V., Fox, J. M., ... Diamond, M. S. (2017). Modified mRNA Vaccines Protect against Zika Virus Infection. *Cell*, 168(6), 1114–1125.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.017>
- Riemer, A. B., & Jensen-Jarolim, E. (2007). Mimotope vaccines: epitope mimics induce anti-cancer antibodies. *Immunology Letters*, 113(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2007.07.008>
- Rodenhuis-Zybert, I. A., Wilschut, J., & Smit, J. M. (2010). Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), 2773–2786. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0357-z>
- Rodríguez, M., Wood, C., Sanchez-López, R., Castro-Acosta, R. M., Ramírez, O. T., & Palomares, L. A. (2014). Understanding internalization of rotavirus VP6 nanotubes by cells: towards a recombinant vaccine. *Archives of Virology*, 159(5), 1005–1015. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1916-z>
- Rouvinski, A., Dejnirattisai, W., Guardado-Calvo, P., Vaney, M. C., Sharma, A., Duquerroy, S., ... Screaton, G. R. (2017). Covalently linked dengue virus envelope glycoprotein dimers reduce exposure of the immunodominant fusion loop epitope. *Nature Communications*, 8(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms15411>
- Rouvinski, A., Guardado-Calvo, P., Barba-Spaeth, G., Duquerroy, S., Vaney, M.-C., Kikuti, C. M., ... Rey, F. A. (2015). Recognition determinants of broadly neutralizing human antibodies against dengue viruses. *Nature*, 520, 109. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/nature14130>
- Rybniiker, J., Nowag, A., Janicki, H., Demant, K., Hartmann, P., & Buning, H. (2012). Incorporation of Antigens into Viral Capsids Augments Immunogenicity of Adeno-Associated Virus Vector-Based Vaccines. *Journal of Virology*, 86(24), 13800–13804. <https://doi.org/10.1128/jvi.01708-12>
- Sáez-Llorens, X., Tricou, V., Yu, D., Rivera, L., Tuboi, S., Garbes, P., ... Wallace, D. (2017). Safety and immunogenicity of one versus two doses of Takeda's tetravalent dengue vaccine in children in Asia and Latin America: interim results from a phase 2, randomised, placebo-controlled study. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(6), 615–625. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30166-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30166-4)
- Schaefer, T., Panda, P., & Wolford, R. (2020). Dengue Fever. Retrieved April 2, 2020, from StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing website: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430732/>
- Shin, H.-J., Franco, L. H., Nair, V. R., Collins, A. C., & Shiloh, M. U. (2017). A baculovirus-conjugated mimotope vaccine targeting Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *PLOS ONE*, 12(10),

- e0185945. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185945>
- Singer, J., Manzano-Szalai, K., Fazekas, J., Thell, K., Bentley-Lukschal, A., Stremnitzer, C., ... Jensen-Jarolim, E. (2016). Proof of concept study with an HER-2 mimotope anticancer vaccine deduced from a novel AAV-mimotope library platform. *Oncoimmunology*, 5(7), e1171446–e1171446. <https://doi.org/10.1080/2162402X.2016.1171446>
- Slon-Campos, J. L., Dejnirattisai, W., Jagger, B. W., López-Camacho, C., Wongwiwat, W., Durnell, L. A., ... Screaton, G. R. (2019). A protective Zika virus E-dimer-based subunit vaccine engineered to abrogate antibody-dependent enhancement of dengue infection. *Nature Immunology*, 20(10), 1291–1298. <https://doi.org/10.1038/s41590-019-0477-z>
- Slon Campos, J. L., Marchese, S., Rana, J., Mossenta, M., Poggianella, M., Bestagno, M., & Burrone, O. R. (2017). Temperature-dependent folding allows stable dimerization of secretory and virus-Associated e proteins of Dengue and Zika viruses in mammalian cells. *Scientific Reports*, 7(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01097-5>
- Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., ... DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *New England Journal of Medicine*, 379(4), 327–340. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1800820>
- Stettler, K., Beltramello, M., Espinosa, D. A., Graham, V., Cassotta, A., Bianchi, S., ... Corti, D. (2016). Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science*, 353(6301), 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8505>
- Swanstrom, J. A., Plante, J. A., Plante, K. S., Young, E. F., MCGowan, E., Gallichotte, E. N., ... Heise, M. T. (2016). Isolated from Dengue Patients Are Protective against Zika Virus. *American Society for Microbiology*, 7(4), 1–8. <https://doi.org/10.1128/mBio.01123-16>. Editor
- Takahashi, H., Ohtaki, N., Maeda-sato, M., Tanaka, M., & Tanaka, K. (2009). Effects of the number of amino acid residues in the signal segment upstream or downstream of the NS2B-3 cleavage site on production and secretion of prM / M-E virus-like particles of West Nile virus. *Microbes and Infection*, 11(13), 1019–1028. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.07.009>
- Terzian, A. C. B., Schanoski, A. S., Mota, M. T. de O., da Silva, R. A., Estofolete, C. F., Colombo, T. E., ... Nogueira, M. L. (2017). Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 65(8), 1260–1265. <https://doi.org/10.1093/cid/cix558>
- Turmel, J. M., Abgueguen, P., Hubert, B., Vandamme, Y. M., Maquart, M., Le Guillou-Guillemette, H., & Leparç-Goffart, I. (2016). Late sexual transmission of Zika virus related to persistence in the semen. *The Lancet*, 387(10037), 2501. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30775-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30775-9)
- Ubol, S., & Halstead, S. B. (2010). How innate immune mechanisms contribute to antibody-enhanced viral infections. *Clinical and Vaccine Immunology*, 17(12), 1829–1835. <https://doi.org/10.1128/CI.00316-10>
- Urabe, M., Ding, C., & Kotin, R. M. (2002). Insect Cells as a Factory to Produce Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors. *Human Gene Therapy*, 13(16), 1935–1943. <https://doi.org/10.1089/10430340260355347>
- Wang, D., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2019). Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(5), 358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Whitehead, S. S., Blaney, J. E., Durbin, A. P., & Murphy, B. R. (2007). Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews Microbiology*, 5(7), 518–528. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1690>
- Whitehead, S. S., Durbin, A. P., Pierce, K. K., Elwood, D., McElvany, B. D., Fraser, E. A., ... Kirkpatrick, B. D. (2017). In a randomized trial, the live attenuated tetravalent dengue vaccine TV003 is well-tolerated and highly immunogenic in subjects with flavivirus exposure prior to vaccination. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(5), e0005584. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005584>
- Wu, S.-C., & Lin, C.-W. (2001). Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Virus Research*, 76(1), 59–69. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00246-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00246-5)
- Xu, X., Vaughan, K., Weiskopf, D., Grifoni, A., Diamond, M. S., Sette, A., & Peters, B. (2016). Identifying Candidate Targets of Immune Responses in Zika Virus Based on Homology to Epitopes in Other Flavivirus Species. *PLoS Currents*, 8, ecurrents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c.



<https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.9aa2e1fb61b0f632f58a098773008c4b>

- Yoshii, K., Igarashi, M., Ichii, O., Yokozawa, K., Ito, K., Kariwa, H., & Takashima, I. (2012). A conserved region in the prM protein is a critical determinant in the assembly of flavivirus particles. *Journal of General Virology*, 93(1), 27–38. <https://doi.org/10.1099/vir.0.035964-0>
- Zhang, X., Jia, R., Shen, H., Wang, M., Yin, Z., & Cheng, A. (2017). Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses*, 9(11), 338. <https://doi.org/10.3390/v9110338>
- Zhao, L., Kopylov, M., Potter, C. S., Carragher, B., Finn, M. G., States, U., ... Biology, S. (2020). Engineering the PP7 Virus Capsid as a Peptide Display Platform. *ACS Nano*, 13(4), 4443–4454. <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b09683>.Engineering
- Zhong, Y., Cai, J., Zhang, C., Xing, X., Qin, E., He, J., ... Song, H. (2011). Mimotopes selected with neutralizing antibodies against multiple subtypes of influenza A. *Virology Journal*, 8(1), 542. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-542>