

**DISEÑO DE UN PROCESO BIOTECNOLÓGICO PARA
LA PRODUCCIÓN EN INSECTOS DEL DOMINIO DE
UNIÓN AL RECEPTOR (RBD) DE LA PROTEÍNA SPIKE
DEL SARS-CoV-2**

Poodts, Joaquín – L.U.: 1092782
Licenciatura en Biotecnología

Tutor

**Targovnik, Alexandra Marisa – Instituto de Nanobiotecnología
(UBA-CONICET)**

Co-Tutor

**Miranda, María Victoria – Instituto de Nanobiotecnología
(UBA-CONICET)**

Co-Tutor

**Vadillo, Martín Javier – Universidad Argentina de la Empresa
(UADE)**

2022

UADE

UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas

Agradecimientos

La realización de la presente Tesis no hubiera sido posible sin una serie de personas que me acompañaron en momentos de adversidad y frustración, me empujaron a seguir adelante, y finalmente celebraron conmigo mis logros.

En primer lugar, quiero agradecer a la Universidad Argentina de la Empresa, que me permitió formarme como profesional, y al Instituto de Nanobiotecnología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires, donde realicé mi Tesis de Licenciatura.

Quiero agradecer a mis tutoras de Tesis, la Dra. Alexandra Marisa Targovnik y la Dra. María Victoria Miranda, quienes me dieron la oportunidad de realizar mi Tesis en su grupo de Investigación. Me acompañaron en los buenos momentos y en los difíciles, y siempre estuvieron ahí para guiarme en el próximo experimento. Además, agradezco su confianza en mí para que pudiera desarrollarme de manera autónoma y su apertura a incluir ideas mías en la Tesis. Por último y no menos importante, les agradezco su apoyo en la escritura de la Tesis, ya que sin su interés constante y sus rápidas correcciones no hubiera sido posible. Les agradezco también al resto de mis compañeros de trabajo, Grego, Joaco, Lu, Nacho y Noelia, por haberme brindado su apoyo, compañerismo y ayuda cada vez que lo necesité. Asimismo, se les agradezco a la Dra. Silvina Valdez y a su equipo de Inmunología por colaborar en la realización de los enzimo-inmunoensayos. Gracias a mis amigos y amigas. A Carla, Dani y Luz, quienes me preguntaban diariamente cómo estoy y cómo va la Tesis, apoyándome y dándome ánimos constantemente. También les agradezco a ellas el haber sido mis compañeras de estudio durante la carrera. A mis amigos incondicionales que dejó mi paso por el secundario, Tote y Martín, les agradezco que hayan estado siempre para acompañarme en los buenos y no tan buenos momentos y para distender. Gracias al resto de mis amigas también, quienes menos o más presentes, siempre estuvieron ahí para apoyarme.

Desde lo más profundo de mi corazón, agradezco a mi familia. Por creer en mí de manera incondicional, de alentarme, darme fuerzas en momentos arduos, y festejar conmigo cada pequeño triunfo. En particular, agradezco a mis padres, Sandra y Sergio, que con todo su esfuerzo me permitieron realizar mis estudios en el primario, en el secundario, y en la Facultad, poniendo mi educación por encima de todo. Gracias por transmitirme la importancia de la formación profesional, de estudiar lo que a uno le gusta, y de trabajar en lo

que uno ama, con la libertad de elección y esa confianza plena en mí. Gracias también a mi hermanos Belén, Facundo y Tomás por preocuparse por mí, cuidarme, acompañarme y escucharme siempre que lo necesité. Y finalmente gracias al resto de familiares, sobre todo a mis tíos Gaby y Esteban y a mi abuela Iaia, quienes menos o más presentes, siempre me apoyaron a lo largo de mi vida.

Resumen

El sistema baculovirus/células de insecto (BEVS) es un sistema simple, rápido, seguro y fácil de escalar para producir proteínas recombinantes a menores costos que los métodos tradicionales basados en células de mamíferos. En los últimos años ha sido ampliamente utilizado en la academia y en la industria para la producción de proteínas estructurales de origen viral. Recientemente, el brote del virus del SARS-CoV-2 en diciembre de 2019 ha tenido un serio impacto en la salud humana. El virus se ha diseminado rápidamente en el mundo ocasionando millones de muertes. Esta situación ha impulsado que diversos organismos públicos y privados concentren sus esfuerzos en la búsqueda de vacunas, terapéuticos y ensayos diagnósticos eficaces para responder rápidamente ante un evento de emergencia epidemiológica. De todas las proteínas estructurales del virus SARS-CoV-2, la proteína S (Spike) resulta ser clave y dentro de ella, el dominio de unión al receptor (RBD) es la región que presenta mayor concentración de sitios antigénicos que son reconocidos por los anticuerpos neutralizantes. Es por ello, que en el presente trabajo se desarrolló un proceso biotecnológico para producir el dominio RBD del SARS-CoV-2 con alto grado de pureza en el sistema baculovirus con el objetivo de contar con este insumo para diferentes aplicaciones. Con el fin de aumentar el rendimiento de expresión de RBD en el sistema, se construyó el baculovirus recombinante AcgpRBDhis que contenía el novedoso promotor quimera denominado polhpSeL. Las células Sf9 crecidas en medio Sf900™ II SFM, suplementadas con 1% de suero fetal bovino, fueron infectadas a multiplicidad de infección de 2. A los 6 días post infección, el sobrenadante fue cosechado y se purificó RBD recombinante en un solo paso por Cromatografía de Iones Metálicos Inmovilizados alcanzando una pureza del 98%, que fue determinada por RP-HPLC y SDS-PAGE, y un rendimiento de 7,5 mg/l. La RBD resultó inmunorreactiva ya que fue incluida en un ensayo de ELISA que permitió detectar de forma específica anticuerpos tanto en muestras provenientes de sueros de pacientes infectados como sueros hiperinmunes de origen equino. En el proceso biotecnológico optimizado, la RBD recombinante producida a partir de 1 L de cultivo alcanza para 75000 determinaciones serológicas (ELISA). El desarrollo en el presente trabajo demuestra que BEVS constituye una plataforma interesante para producir altas cantidades de RBD con una pureza adecuada para el desarrollo de ensayos diagnóstico.

Abstract

The Baculovirus/Insect Cell System (BEVS) is a simple, fast, safe and easy-to-scale system for producing recombinant proteins at lower costs than traditional methods based on mammalian cells. In recent years it has been widely used in academia and industry for the production of structural proteins of viral origin. Recently, the outbreak of the SARS-CoV-2 virus in December 2019 has had a serious impact on human health. The virus has spread rapidly around the world, causing millions of deaths. This situation has prompted various public and private organizations to concentrate their efforts on the search for effective vaccines, therapeutics and diagnostic tests to respond quickly to an epidemiological emergency event. Of all the structural proteins of the SARS-CoV-2 virus, the S protein (Spike) turns out to be key and within it, the receptor-binding domain (RBD) is the region that presents the highest concentration of antigenic sites that are recognized by neutralizing antibodies. That is why in the present work a biotechnological process was developed to produce the RBD domain of SARS-CoV-2 with a high degree of purity in the baculovirus system with the aim of having this input for different applications. In order to increase the expression yield of RBD in the system, the AcgpRBDhis baculovirus was constructed which contained a novel chimeric promoter named polhpSeL. Sf9 cells grown in Sf900™ II SFM medium, supplemented with 1% fetal bovine serum, were infected at a multiplicity of infection of 2. At 6 days post infection, the supernatant was harvested and recombinant RBD was purified in a single step by Immobilized Metal Ion Chromatography reaching a purity of 98% which was determined by RP-HPLC and SDS-PAGE and a yield of 7.5 mg / L. The recombinant purified RBD was immunoreactive since it was included in an ELISA assay that allowed the specific detection of antibodies both in samples from infected patients' sera and hyperimmune sera from equine origin. In the optimized biotechnological process, the recombinant RBD produced from 1 L of culture reaches 75000 serological determinations (ELISA). The development in the present work shows that BEVS constitutes an interesting platform to produce high amounts of RBD with adequate purity for the development of diagnostic assays.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	11
GLOSARIO	12
1. INTRODUCCIÓN	14
1.1. Baculovirus	14
1.1.1. Taxonomía y estructura de baculovirus.....	14
1.1.2. Ciclo de infección.....	17
1.2. Aplicaciones del sistema baculovirus	21
1.2.1. Baculovirus como insecticidas	21
1.2.2. Baculovirus como sistema de expresión.....	22
1.3. Dominio de unión al receptor de la proteína Spike del SARS-CoV-2	31
1.4. Purificación de proteínas recombinantes	35
2. OBJETIVOS	37
2.1. Objetivo general.....	37
2.2. Objetivos específicos	37
3. MATERIALES Y MÉTODOS	38
3.1. Clonado de la secuencia de RBD en el vector pAcGP67-B para la obtención del plásmido recombinante pAcGP67-RBD.....	38
3.1.1. Obtención de la secuencia de RBD	38
3.1.2. Obtención del plásmido pAcGP67-B	39
3.1.3. Doble digestión de RBDhis y de pAcGP67-B	40
3.1.4. Ligación	40
3.1.5. Preparación de células ultracompetentes por el método químico.....	41
3.1.6. Transformación de E. coli DH5α competentes con el vector recombinante pAcGP67-RBDhis.....	41
3.1.7. Análisis de colonias	42
3.2. Clonado de gpRBDhis en pFBD-polhpSeL-x para la obtención del vector donador pFBD-polhpSeL-gpRBDhis.....	43
3.2.1. Obtención de la secuencia de gpRBDhis.....	43
3.2.2. Obtención del plásmido donador pFBD-polhpSeL-X.....	44
3.2.3. Digestión simple de gpRBDhis y de pFBD-polhpSeL-X.....	45
3.2.4. Ligación	46
3.2.5. Transformación de E. coli DH5 competentes con el vector recombinante pFBD-polhpSeL-gpRBDhis	46
3.2.6. Análisis de colonias	47
3.3. Obtención del baculovirus recombinante.....	47
3.3.1. Preparación de bacterias competente DH10Bac™.....	47
3.3.2. Generación y purificación del bácmido recombinante	48
3.3.3. Cultivo de células de insecto	49
3.3.4. Transfección mediada por liposomas	50
3.3.5. Amplificación del virus recombinante	51

3.3.6.	Titulación viral por el método de dilución a punto final (Reed y Muench)	52
3.4.	Expresión de RBD en cultivos celulares en suspensión	53
3.5.	Purificación de RBD por IMAC	53
3.6.	Caracterización de RBD recombinante.....	54
3.6.1.	Determinación de la concentración de proteínas totales y RBD	54
3.6.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y Western blot	55
3.6.3.	Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).....	56
3.6.4.	Análisis de la presencia de ADN viral en las fracciones cromatográficas	56
3.7.	Evaluación de la inmunorreactividad de RBD recombinante.....	57
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	58
4.1.	Clonado de RBD	58
4.1.1.	Obtención del vector donador pFBD-polhpSeL-gpRBDhis	58
4.2.	Generación del baculovirus recombinante AcgpRBDhis	64
4.3.	Expresión de RBD en sobrenadantes de cultivo de células Sf9	66
4.4.	Purificación de RBD de sobrenadantes de cultivos celulares por IMAC	67
4.5.	Determinación de la condición óptima para la expresión de RBDhis en sobrenadantes de cultivo de células Sf9	73
4.6.	Detección de anticuerpos en sueros de pacientes vacunados o infectados con SARS-CoV-2 con RBDhis recombinante.....	75
4.7.	Descripción de un proceso de producción de RBDhis recombinante en el sistema BEVS y análisis de costos	76
5.	CONCLUSIONES.....	79
	ANEXO A. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN PROCESOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR.....	80
	ANEXO A. SECUENCIA DE gpRBDhis	81
	ANEXO B. SECUENCIA DE pAcGP67-B (3901-4535)	83
	ANEXO C. SECUENCIA DE pFBD-polhpSeL-X (4312-5728).....	84
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cuerpos de oclusión de baculovirus.	15
Figura 2. Esquema de las estructuras de los dos fenotipos de viriones de Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de <i>Autographa californica</i> (AcMNPV).	16
Figura 3. Esquema del ciclo de infección de AcMNPV.....	19
Figura 4. Ilustración de larvas en diversas etapas de la infección por baculovirus.....	20
Figura 5. Sistema Bac-to-Bac™ utilizado para la construcción de baculovirus recombinantes y expresión de proteínas en el sistema BEVS.....	24
Figura 6. Vías de N-glicosilación producidas en células de insecto y de mamíferos. ...	29
Figura 7. Estructura de la proteína S del SARS-CoV-2.	33
Figura 8. Representación esquemática del vector pAcGP67-B.....	40
Figura 9. Representación esquemática del vector pAcGP67-RBDhis.	42
Figura 10. Representación esquemática del vector pFBD-polhpSeL-X.	45
Figura 11. Representación esquemática del vector pFBD-polhpSeL-gpRBDhis.	46
Figura 12. Gel de agarosa 1% del producto de digestión de pAcGP67-B y RBDhis con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y posteriormente purificados.....	58
Figura 13. Verificación por PCR Colony del clonado de RBDhis en el vector pAcGP67-B.	59
Figura 14. Representación esquemática del clonado de RBDhis en el vector pAcGP67-B para obtener la construcción pAcGP67-RBDhis.	60
Figura 15. Gel de agarosa del vector pFBD-polhpSeL-X e inserto gpRBDhis digeridos con la enzima de restricción EcoRI y purificados.....	61
Figura 16. Verificación por PCR Colony del clonado de gpRBDhis en pFBD-pollhpSeL-X.....	62
Figura 17. Representación esquemática del clonado de gpRBDhis en el vector pFBD-polhpSeL-X para obtener la construcción pFBD-polhpSeL-gpRBDhis.	63

Figura 18. Verificación por PCR de la transposición del cassette de expresión al b́acmido presente en bacterias E. coli DH10Bac™.	64
Figura 19. Gel de agarosa 1% de la extracci3n del b́acmido.	65
Figura 20. Microfotografías de c3lulas Sf9 bajo microscopio de fluorescencia para el monitoreo de la expresi3n de GFP (40x).	65
Figura 21. Esquema del baculovirus AcgpRBDhis.	66
Figura 22. Cin3tica de expresi3n de RBD en c3lulas Sf9 crecidas en medio de cultivo suplementado con 1% de SFB.	67
Figura 23. Seguimiento de la purificaci3n de RBDhis por IMAC de sobrenadantes de expresi3n por SDS-PAGE revelado con tinci3n de Coomassie Blue (A) y Western Blot (B).	69
Figura 24. Análisis y cuantificaci3n de la RBD purificada a partir de SDS-PAGE y densitometría utilizando el programa ImageJ. (A) SDS-PAGE. (B) Curva de calibraci3n con una soluci3n patr3n de SAB.	70
Figura 25. Análisis por RP-HPLC de la RBD recombinante purificada.	71
Figura 26. Verificaci3n por PCR de la presencia de ADN viral en las fracciones cromatogŕaficas.	72
Figura 27. Comparaci3n de los niveles de expresi3n de RBD en c3lulas Sf9 crecidas en medio de cultivo suplementado con distintas concentraciones de SFB a los dpi 4, 5 y 6. Western blot (A) y densitometría utilizando el programa ImageJ (B).	74
Figura 28. Evaluaci3n de la inmunorreactividad de RBD para la detecci3n de anticuerpos en sueros hiperinmunes equinos.	75
Figura 29. Resultados obtenidos por el ELISA, expresados como SDs, para la determinaci3n de anticuerpos anti-RBD empleando sueros de individuos controles normales y de pacientes COVID-19 +.	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Biológicos aprobados por FDA o EMA, producidos con BEVS.	30
Tabla 2. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la secuencia de RBD. ...	39
Tabla 3. Precios de las principales empresas que comercializan RBD.	78
Tabla 4. Costo de producción requeridos para producir de 7,5 mg de RBD.	78
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en procesos de amplificación por PCR.	80

GLOSARIO

°C: Grados centígrados (Celsius).

AcgpRBDhis: Virus recombinante portador del gen de la proteína RBD fusionada a una etiqueta de 6 histidinas y a la señal de secreción de origen viral GP64.

AcMNPV: Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de *Autographa californica* (del inglés *Autographa californica Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus*).

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ARN: Ácido ribonucleico.

BEVS: Sistemas de vectores de expresión de baculovirus (del inglés *Baculovirus Expression Vector Systems*).

BmNPV: Virus de la Poliedrosis Nuclear de *Bombyx mori* (del inglés *Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis Virus*).

BV: Virus brotado (del inglés *Budded Virus*).

dpi: Días post infección.

EDTA: Acido etilénico diamino tetracético, quelante de iones bivalentes.

ELISA: Enzimoimmunoensayo (del inglés *enzyme linked immunosorbent assay*).

FDA: *Food and Drug Administration*.

g: Gramo.

EGFP: Proteína verde fluorescente mejorada (del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*).

NAG: N-Acetilglucosamina.

GSK: *GlaxoSmithKline*

GV: Virus de la Granulosis (del inglés *Granulosis Virus*).

his: Histidinas.

hpi: Horas post-infección.

IMAC: Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados

kDa: Kilodalton.

kb: Kilobases.

M: Molar.

MOI: Multiplicidad de infección (del inglés *Multiplicity of infection*)

MNPV: Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple (del inglés *Multiple Nuclear Polyhedrosis Virus*).

Ni: Níquel.

ml: Mililitro.

nm: Nanómetros.

OB: Cuerpos de oclusión (del inglés *Occlusion Bodies*).

ODV: Virus ocluido (del inglés *Occlusion-Derived Virus*).

ORF: Marco de lectura abierto (del inglés *Open Reading Frame*).

pb: pares de bases.

PBS: Buffer de fosfatos salino (del inglés *Phosphate Buffered Saline*).

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*).

p10: p10, gen.

PM: Peso molecular.

Polh: Poliedrina, gen (del inglés *polyedrin*).

RBD: Dominio de unión a receptor (del inglés *Receptor Binding Domain*).

rpm: Revoluciones por minuto.

SAB: Seroalbúmina bovina.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

Sf9: Línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*.

SFB: Suero fetal bovino.

SNPV: Virus de la Poliedrosis Nuclear Simple (del inglés *Single Nuclear Polyhedrosis Virus*).

TA: temperatura ambiente.

TB: Transferrina bovina.

Tn-5: Línea celular derivada de *Trichoplusia ni*.

Tris: Tris-hidroximetil-aminometano.

UFP: Unidades formadoras de placa.

U: Unidades.

µm: Micrómetros.

µM: Micromolar.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Baculovirus

1.1.1. Taxonomía y estructura de baculovirus

La familia *Baculoviridae* está constituida por un grupo muy diverso de virus específicos de artrópodos. Estos se caracterizan por poseer un genoma de ADN doble cadena circular superenrollado, con un tamaño variable de 80–180 kb, que codifica entre 90 y 180 genes (Summers y Andersons, 1972; Burgess, 1977). Su genoma se encuentra envuelto por una cápside proteica, la cual les otorga su distintiva forma de bastón, de donde deriva el nombre “baculovirus”. El ADN más la cápside constituyen la nucleocápside (la unidad infectiva viral), capaz de medir 230–385 nm de longitud y 40–60 nm de diámetro (Akermann y Smirnoff, 1983; Federici, 1986). Su rango de huésped está restringido a los artrópodos. Las células de mamíferos solo son susceptibles a transfecciones con alta carga viral, sin embargo, estos no pueden propagarse en ellas (Beljelarskaya, 2002).

Los baculovirus son reconocidos por formar en sus hospedadores grandes cuerpos proteicos, denominados cuerpos de oclusión (OB, del inglés *Occlusion Bodies*) (Figura 1), que son estructuras de resistencia que favorecen la supervivencia viral frente a condiciones ambientales adversas fuera del hospedero, como la radiación ultravioleta, la desecación y la acción de nucleasas. Según la proteína mayoritaria presente en los OB, poliedrina o granulina, los baculovirus se pueden dividir en los géneros Nucleopoliedrovirus (NPV) o Granulovirus (GV), respectivamente (Figura 1).

A lo largo de su ciclo de vida, se producen dos fenotipos de viriones bioquímica y morfológicamente distintos (Figura 2). Uno brota de la membrana plasmática de la célula hospedera llevándose consigo parte de ésta hacia el medio extracelular (virus brotado, BV, del inglés *Budded Virus*). La envoltura resultante presenta proyecciones denominados peplómeros constituidos por una glicoproteína codificada por el virus, llamada GP67 o GP64 (O'Reilly *et al*, 1992). Esta glicoproteína es importante para la infección secundaria del virus ya que está íntimamente relacionada con su entrada a las células huésped, mediada por endocitosis (Volkman *et al*, 1984; Volkman y Goldsmith, 1985). Los BV son los responsables de la transmisión de la infección tanto de una célula a otra como de un tejido a otro dentro del insecto. Por otro lado, los viriones pueden adquirir una membrana sintetizada de *novo* en el núcleo de la célula hospedera, pudiendo encontrarse más

de una nucleocápside por virión, y ser ocluidos en una matriz proteica cristalina o poliedro (virus ocluido, ODV, del inglés *Occlusion-Derived Virus*) dando lugar a la formación de los OB que permanecen en el núcleo de la célula infectada. A su vez, cada poliedro se encuentra recubierto por una membrana externa llamada cálix (Figura 1A), que confiere estabilidad a la matriz de poliedrina. Los ODV son los responsables de la transmisión horizontal entre individuos susceptibles y de iniciar la infección primaria en las células epiteliales mesentéricas.

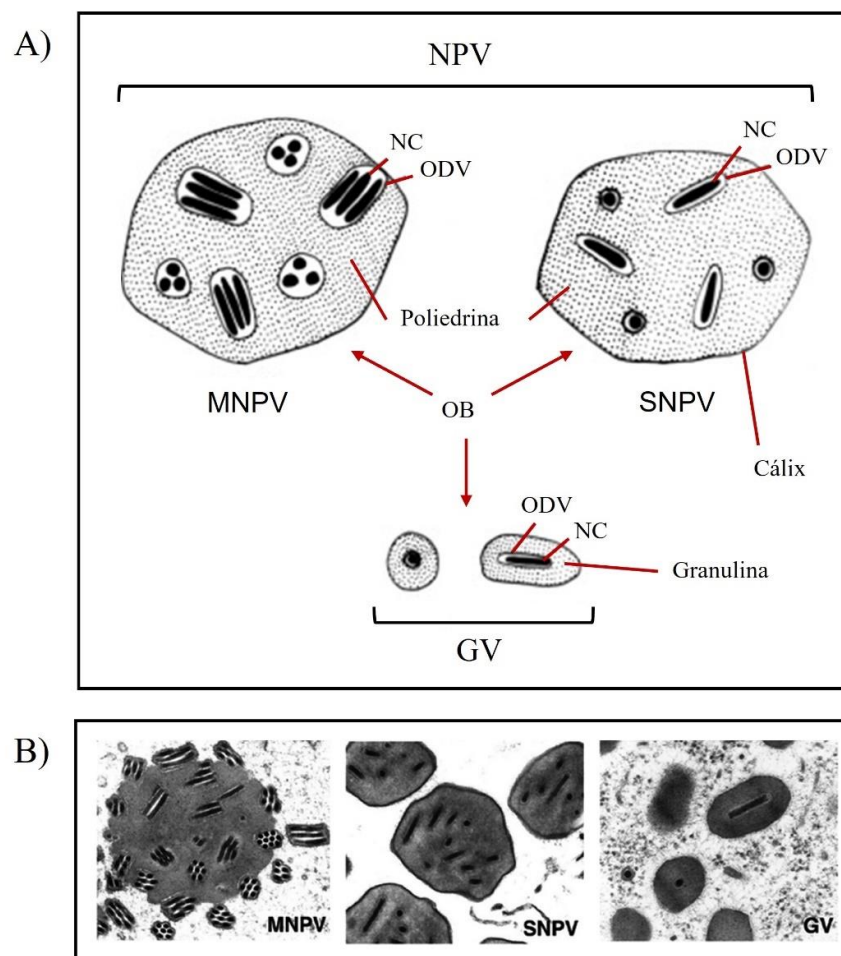


Figura 1. Cuerpos de oclusión de baculovirus. A) Se ilustran las estructuras de los cuerpos de oclusión (OB) de los baculovirus del género Nucleopoliedrovirus (NPV) y Granulovirus (GV). Los viriones ocluidos (ODV) presentes en los OB de NPV pueden contener múltiples nucleocápsides (MNPV) o una sola nucleocápside (SNPV). Cada OB está recubierto por una membrana externa (cálix). B) Micrografías electrónicas de transmisión de cuerpos de oclusión (MNPV, SNPV y GV). Tomada y adaptada de Bonning (2005) y Herniou *et al* (2011).

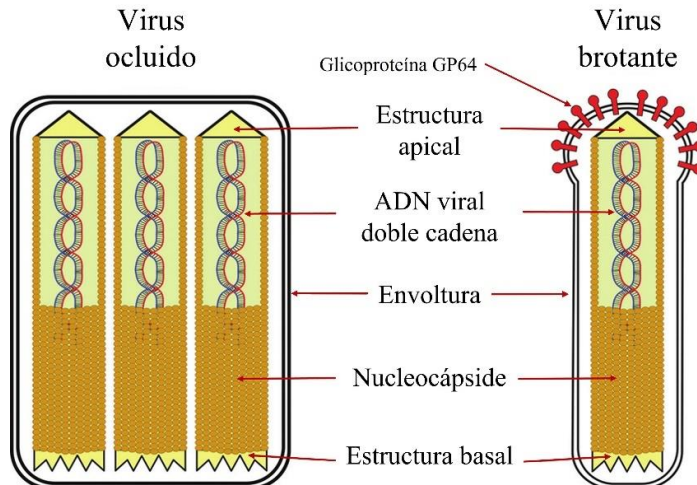


Figura 2. Esquema de las estructuras de los dos fenotipos de viriones de Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV). La primera forma fenotípica, los virus ocluidos (ODV), contienen múltiples nucleocápsides, y se encuentran dentro de una matriz de poliedrina, formando el cuerpo de oclusión (OB) o poliedro. La segunda forma fenotípica, los virus brotados (BV), presentan en su superficie apical la proteína de fusión GP64, formando el peplómero. Tomada y adaptada de Harrison *et al* (2018).

Se han reportado baculovirus de una variedad de diferentes especies de invertebrados. No obstante, los únicos huéspedes bien documentados son insectos del orden Diptera (moscas y mosquitos), Hymenoptera (abejas, avispas, hormigas) y Lepidoptera (mariposas y polillas). También se ha evidenciado la presencia de ODV en el orden Trichoptera y una especie de camarón (Hall y Hazard, 1973; Couch, 1974). Desde la década del '90, se han secuenciado distintos genomas de baculovirus, ofreciendo una gran cantidad de información sobre la diversidad genética, las secuencias y el contenido de los genes, la organización del genoma y la filogenia de los genomas de baculovirus. Actualmente, la familia *Baculoviridae* ya no se encuentra dividida en los dos géneros previamente descritos, GV y NPV, sino en cuatro géneros en función de evidencia filogenética y características biológicas y morfológicas, como el huésped que infectan. Los virus que infectan el orden Lepidoptera se dividen en *Alphabaculoviridae* y *Betabaculoviridae* y los que infectan Hymenoptera y Diptera se denominan *Gammabaculoviridae* y *Deltabaculoviridae*, respectivamente (Jehle *et al*, 2006; Herniou *et al*, 2011). Los NVP de lepidópteros se dividen a su vez en dos grupos, I y II, que difieren en la proteína de fusión codificada por cada grupo. Los NVP del Grupo I utilizan la proteína de fusión GP64 y los NVP del Grupo II utilizan la proteína F (Zanotto *et al*, 1993; Pearson y Rohrmann, 2002). Una

característica destacada de los NVP es la organización de las nucleocápsides en agregados simples (SNPV) o múltiples (MNPV) dentro de los poliedros (Figura 1A). Por otra parte, el género *Granulovirus* (GV) se caracteriza por generar OB más pequeños, granulares y de forma elipsoidal (Figura 1A). Si bien se han descrito rara vez GV múltiples, se los clasificó principalmente como simples (Bilimoria y Kustak, 1991; Bilimoria, 2017).

Los baculovirus son nombrados con la primera letra correspondiente al género y especie del huésped a partir del cual fueron inicialmente aislados seguido del grupo al que pertenecen (GV, MNPV o SNPV). El Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de *Autographa californica* (AcMNPV) y el Virus de la Poliedrosis Nuclear *Bombyx mori* (BmNPV) son los más estudiados. AcMNPV infecta 32 especies de insectos del género Lepidoptera y es extensamente utilizado en la producción de proteínas recombinantes. Su genoma fue el primero en secuenciarse y consta de 134 kb y codifica para unos 150 ORFs (del inglés *Open Reading Frame*) aproximadamente. Además, este virus es capaz de multiplicarse en diversas líneas celulares, como por ejemplo Sf9 derivada de tejido ovárico de larvas *Spodoptera frugiperda* y Tn-5 derivada de tejido ovárico de larvas *Trichoplusia ni* (Francki *et al*, 1991; O'Reilly *et al*, 1992; Ayres *et al*, 1994; Beljelarskaya, 2002). Las consideraciones que se describen a continuación se focalizarán en este baculovirus, ya que es el arquetipo de su género, y el que se utilizó para el presente trabajo de Tesis.

1.1.2. Ciclo de infección

Los baculovirus han evolucionado para iniciar la infección en el intestino medio del insecto y luego propagar la infección a otros tejidos por todo el insecto. La Figura 3 describe el ciclo infectivo de AcMNPV. En la naturaleza, el ciclo infectivo inicia cuando una larva de insecto susceptible ingiere poliedros baculovirales, que se encuentran en la superficie de las hojas foliares. Tras la ingestión, las condiciones alcalinas del intestino medio de las larvas provocan la disolución de los OB y la liberación de los ODV. Gracias a la acción de metaloproteasas asociadas, los ODV atraviesan la membrana peritrófica de la larva (Slack y Arif, 2007), que separa el lumen del epitelio del intestino medio (Hegedus *et al*, 2009), lo que permite el acceso del virus a la superficie de las células epiteliales. Los viriones entran en las células epiteliales de intestino por fusión con las microvellosidades de la membrana plasmática (Granados y Williams., 1986) y luego migran

desde el citoplasma al núcleo, en donde ocurre el desnudamiento del genoma y tiene lugar el primer ciclo de replicación, que culmina en el ensamblaje de nuevas nucleocápsides (King y Posee, 1992; Wu *et al*, 2013). Éstas son transportadas al citoplasma y llegan a la membrana plasmática celular, donde se alojan proteínas virales como GP64 (Rohrmann, 2019; King y Posee, 1992). La membrana plasmática celular, junto con proteínas virales, forman la envoltura de la nucleocápside, y, así, los nuevos viriones (BV) brotan fuera de la célula en dirección basal, facilitando la infección secundaria o sistémica, dado que tienen tropismo por los demás tipos celulares (Rohrmann, 2019). El sistema traqueal de la larva es la vía de propagación de la infección, ya que se encuentra en contacto con células epiteliales y de otros tejidos (O'Reilly *et al*, 1994). En lepidópteros, AcMNPV causa infecciones poliorganotrópicas, que incluyen intestino, epidermis, tejido muscular y tejido nervioso (Federici, 1997).

Para la infección sistémica en larvas, y también para la infección de cultivos celulares *in vitro*, los BV ingresan a las células por endocitosis mediada por receptor gracias a la glicoproteína de origen viral GP64 (Figura 2) (Blissard, 1996). Dicha proteína es crucial para la infectividad del virus, ya que, luego de mediar el ingreso del virus a la célula susceptible, promueve la fusión de la membrana del compartimento endosomal con la envoltura viral, y así, las nucleocápsides son liberadas al citoplasma (Long *et al*, 2006). Tal como se describió anteriormente, las nucleocápsides se transportan al núcleo, donde se llevarán a cabo los procesos de replicación y transcripción de genes virales.

En una etapa más tardía de la infección comienza la formación de los poliedros. Las nucleocápsides adquieren su envoltura en el núcleo para formar los ODV y, finalmente, los ODV se ocluyen en una matriz de poliedrina formando los OB. A medida que la infección progresa, los OB se acumulan hasta que comprimen el citoplasma. Durante el ciclo de infección el insecto continúa alimentándose por cinco a siete días, se vuelven letárgicos, su cutícula se decolora y la musculatura se desintegra por la actividad de proteínas virales quitinasa y catepsina, y la larva se convierte en un saco cuticular con un fluido lleno de OB. Finalmente, la cutícula se rompe y los OB son liberados al ambiente, pudiendo reiniciarse el ciclo viral a través de la ingestión de los OB por otro huésped (Granados y Williams., 1986) (Figura 4).

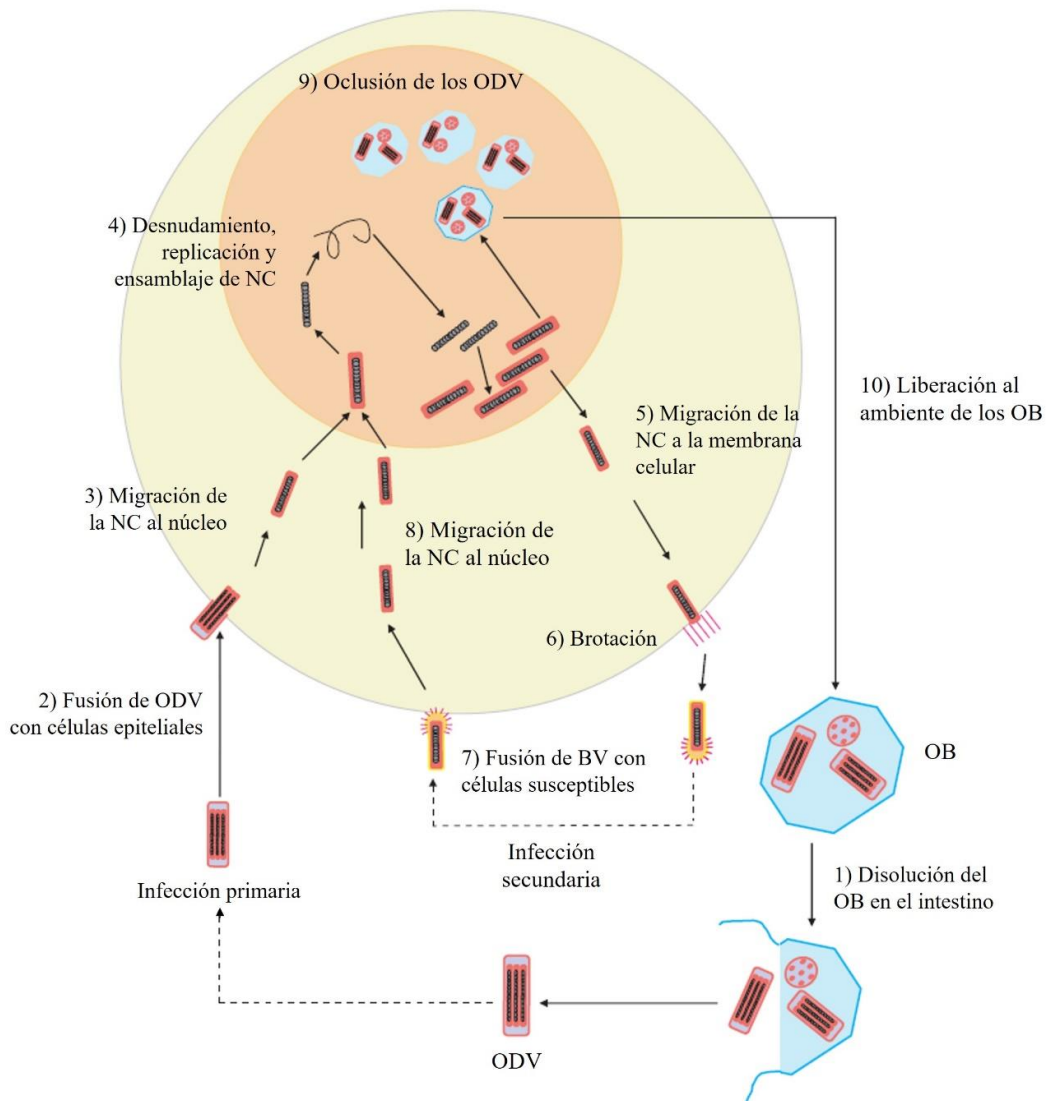


Figura 3. Esquema del ciclo de infección de *AcMNPV*. Los poliedros del ambiente son ingeridos por una larva que es susceptible a la infección por el baculovirus. El entorno alcalino del intestino medio del insecto disuelve los poliedros (1) para liberar los viriones ocluidos. Estos se fusionan con las células epiteliales del intestino medio (2) y entran en la célula. Las nucleocápsides (NC) viajan e ingresan al núcleo (3), donde sucede el desnudamiento, replicación del genoma y formación de nuevas NC (4). Las NC abandonan el núcleo y migran hasta la membrana plasmática (5) donde brotan (6). Luego, los BV se adhieren a otras células susceptibles (7), quedan sin recubrimiento dentro del citoplasma celular y los NC se trasladan al núcleo (8), tras lo cual se produce nuevamente la traducción, producción de NC y BV adicionales (4–6). Durante las últimas etapas de la infección, los NC que permanecen dentro del núcleo se ocluyen dentro de los poliedros (9) que se liberan de la célula tras la muerte celular y la licuefacción del huésped (10). Tomada y adaptada de Haines *et al* (2008).



Figura 4. Ilustración de larvas en diversas etapas de la infección por baculovirus. A) Larva no infectada B) Larva muerta infectada con NPV que cuelga en la postura típica de marchitez. C) Larva muerta cuya cutícula se rompió liberando un fluido repleto de OB. Tomada y adaptada de Grzywacz (2017).

La síntesis de BV y OV es temporalmente regulada. En un típico ciclo viral durante la infección con AcMNPV de un cultivo de células, los BV son liberados al medio de cultivo a las 12 horas post infección (hpi) y su liberación continúa hasta las 22 hpi. La formación de ODV comienza a las 20 hpi y continúa hasta las 70 hpi cuando se forman entre 70–100 poliedros en el núcleo. Esta regulación temporal está reflejada en el control transcripcional de genes virales específicos (Miller *et al*, 1986). La transcripción de los genes del baculovirus está regulada en forma de cascada y en un cultivo celular se puede dividir en tres etapas: 1) reprogramación de la célula para la replicación viral (temprana), 2) producción de BV (tardía), 3) producción de ODV (muy tardía). (O'Reilly *et al*, 1992). Durante la fase temprana (0–6 hpi) se expresan los genes requeridos para la replicación viral, y se produce el denominado *shut off* de las proteínas de la célula huésped. Una vez que el ADN viral llega al núcleo (30 minutos aproximadamente), se inicia la etapa de transcripción (Chisholm *et al*, 1988). Durante este periodo se observan cambios importantes en las células, tales como, rearrreglos del citoesqueleto y alargamiento de los núcleos (Charlton y Volkman, 1991). Los acontecimientos que siguen al comienzo de la replicación se pueden dividir en fase tardía (6–18 hpi) y fase muy tardía (18–72 hpi). Durante la fase tardía, se transcriben los genes que codifican para las proteínas estructurales de la nucleocápside viral, tales como p39, la proteína principal de la cápside y el core, y una proteína básica de 6,9 kDa asociada al ADN (Tweeten *et al*, 1980). La fase muy tardía se caracteriza por una disminución de la producción de BV y un notable incremento de la expresión de genes involucrados en la formación de los OB como poliedrina y p10 (Summers y Smith, 1978). Mientras que la poliedrina constituye el principal componente de los OB, el polipéptido p10, que está asociado a estructuras fibrilares

citoplasmáticas y nucleares en células infectadas, se encuentra implicado en la formación de la envoltura de poliedrina y en la ruptura de las membranas celulares (Chaabihi *et al*, 1993; Van Oers y Vlak, 1997). La poliedrina llega a constituir el 25% del peso seco de la larva al final de la infección. Tanto el gen de la poliedrina como el gen de p10 contienen promotores muy fuertes resultando ser las proteínas mayoritarias en las células infectadas (30–50% del total de proteínas). Sin embargo, éstas no son indispensables para la replicación viral en cultivos celulares (Bejerlarskaya, 2002). Es por eso que muchos genes heterólogos son expresados en células de insectos bajo el control de estos promotores virales donde han sido reemplazados los marcos de lectura de estos genes endógenos.

1.2. Aplicaciones del sistema baculovirus

1.2.1. Baculovirus como insecticidas

En las últimas décadas, la valoración de los impactos negativos del uso de insecticidas en el medio ambiente y la salud llevó a esfuerzos dirigidos de reducir el control químico de plagas y malezas. En función de lo anterior, la primera aplicación de los baculovirus fue su uso como ingrediente activo de productos insecticidas para el control de plagas agrícolas y forestales (Haase *et al*, 2015; Lacey *et al*, 2015). Entre los virus de insectos que se encuentran en la naturaleza, los baculovirus fueron considerados para el desarrollo de la mayoría de los bioplaguicidas virales comerciales ya que en los ecosistemas juegan un papel importante en la supresión de una variedad de diferentes tipos de insectos. Una vez que se entendió el papel que estos virus desempeñaban en el control de las poblaciones naturales de insectos, se consideraron para una variedad de programas de control de insectos, particularmente de las plagas forestales (Huber, 1986). No obstante, a pesar de ese gran interés y atractivo de su aplicación, la aceptación y uso de virus para el control de insectos ha sido limitada. Esto se puede atribuir a su lenta velocidad de muerte, su rango limitado de hospedadores y la complejidad de producir preparaciones virales estandarizadas. La baja velocidad de destrucción puede ser una ventaja particular para el virus, porque eso genera un rendimiento viral mayor, pero los retrasos en la muerte del huésped a su vez dan como resultado que el insecto infectado consuma más vegetación. Otro factor que contribuye al uso limitado de baculovirus para el control biológico es que la producción de insecticidas virales requiere mucha mano de obra. Por ello, su

uso se limitó a cultivos de alto valor, particularmente a aquellos que se han vuelto resistentes a insecticidas químicos, o a cultivos en países con acceso a mano de obra relativamente barata (Rohrmann, 2019).

1.2.2. Baculovirus como sistema de expresión

El sistema baculovirus es un método simple, seguro, rápido y fácil de escalar para producir proteínas recombinantes a un costo menor que los sistemas tradicionales basados en líneas celulares de mamíferos. Este sistema ha sido extensamente utilizado para la producción de proteínas recombinantes de diversos orígenes como: bacterias, hongos, plantas, virus e incluso proteínas humanas (Demain y Vaishnav, 2009; Roldão *et al*, 2011; Cox, 2012). El baculovirus resulta un sistema muy versátil para expresar proteínas recombinantes debido a que: 1) posee una nucleocápside flexible que posibilita acomodar grandes fragmentos de ADN foráneo sin alterar su capacidad infectiva, 2) permite expresar proteínas solubles en las células de insecto a diferencia de lo que ocurre en bacterias, 3) utiliza promotores virales fuertes que hacen posible la obtención de elevados niveles de expresión, 4) permite obtener proteínas multiméricas similares a análogos estructurales, ya que es posible expresar varios genes al mismo tiempo, 5) las células de insecto proveen un ambiente eucariota apto para la maduración y modificación de las proteínas, y 6) tiene la capacidad de desactivar la mayoría de los genes del huésped y otros genes muy tardíos en la infección y activar específicamente genes muy tardíos, lo que permite dirigir la maquinaria de síntesis de proteínas del huésped hacia la síntesis de las proteínas recombinantes (Fraser, 1986; Beljelarskaya, 2002; Rohrmann, 2019). Los factores que pueden influir en la expresión de genes heterólogos son: la naturaleza del gen y de la proteína que codifica, el estado metabólico de la célula de insecto y la multiplicidad de infección (número de partículas virales infectivas por célula), entre otros. Además, los baculovirus no infectan a vertebrados y, aunque se ha descubierto que los BV pueden transducir células de mamíferos que no son sus huéspedes naturales (Airenne *et al*, 2011; Ono *et al*, 2018; Parsza *et al*, 2021) el ADN viral es incapaz de alcanzar el núcleo para replicar y/o expresarse y generar viriones (Tija *et al*, 1983; Kost y Condreay 2002; Parsza *et al*, 2021). Por lo tanto, los baculovirus pueden ser manipulados en instalaciones con

nivel I de bioseguridad sin necesitar mayor contención que la de un laboratorio estándar (Palomares *et al*, 2015)

Inicialmente, los baculovirus recombinantes se obtenían mediante recombinación homóloga en células de insecto entre el genoma viral y un plásmido donador (Smith *et al*, 1983). Sin embargo, esta metodología no era muy eficaz ya que tan solo el 0,1% de la progenie viral era recombinante, lo que requería varias rondas de ensayos de placa para el aislamiento de virus recombinantes. La primera mejora fue proporcionada por Kitts *et al* (1990) al desarrollar un genoma viral que se encontraba linealizado en el sitio de inserción del gen, aumentando el porcentaje de baculovirus recombinantes hasta en un 30%. Poco después, se construyó un genoma viral que presentaba una delección letal en un gen esencial (ORF1629) que solo era recuperado luego de la recombinación homóloga. Esto derivó en un aumento substancial en las tasas de recombinación (100%) y la obtención de progenie viral recombinante (Kitts y Possee, 1993). El vector viral original que contenía estas mejoras se denominó BacPAK6™, y posteriormente se desarrollaron otros vectores virales basados en el mismo principio que estuvieron comercialmente disponibles, como el sistema de expresión de baculovirus BaculoGold™ (BD Biosciences). Un avance importante fue el desarrollo del primer bácido (bMON14272), un vector que contenía el genoma completo del AcMNPV que podía propagarse en células de *E. coli* DH10Bac™ (Luckow *et al*, 1993) y hoy en día es comercializado por Invitrogen como el sistema Bac-to-Bac® (Figura 5). La introducción del gen de interés en el bácido se produce en el huésped bacteriano y se basa en la transposición sitio-específica de un vector donador que contiene el gen de interés hacia el genoma del baculovirus en el sitio mini-attTn7 del bácido presente en las bacterias *E. coli* DH10Bac™. La reacción de transposición ocurre gracias a la transposasa que se encuentra codificada en el plásmido *Helper* (bMON7124), también presente en las bacterias *E. coli* DH10bac™. Este sistema ha tenido gran aceptación y es muy usado porque el aislamiento posterior de ADN recombinante de bacterias y la transfección en células de insecto normalmente da como resultado un virus viable 100% recombinante. El sistema Bac-to-Bac™, en comparación al sistema tradicional que se basa en recombinación homóloga, ofrece las siguientes ventajas: 1) requiere menos de 2 semanas identificar y purificar un baculovirus recombinante, mientras otras metodología requerían 4–6 semanas, 2) se reduce la necesidad de múltiples rondas de purificación de aislamiento viral, ya que el ADN del virus recombinante no se

mezcla con virus parentales no recombinantes, y 3) permite el aislamiento rápido y simultáneo de múltiples baculovirus recombinantes y es adecuado para la expresión de variantes de proteínas para estudios de estructura y función (ThermoFisher Scientific, 2015).

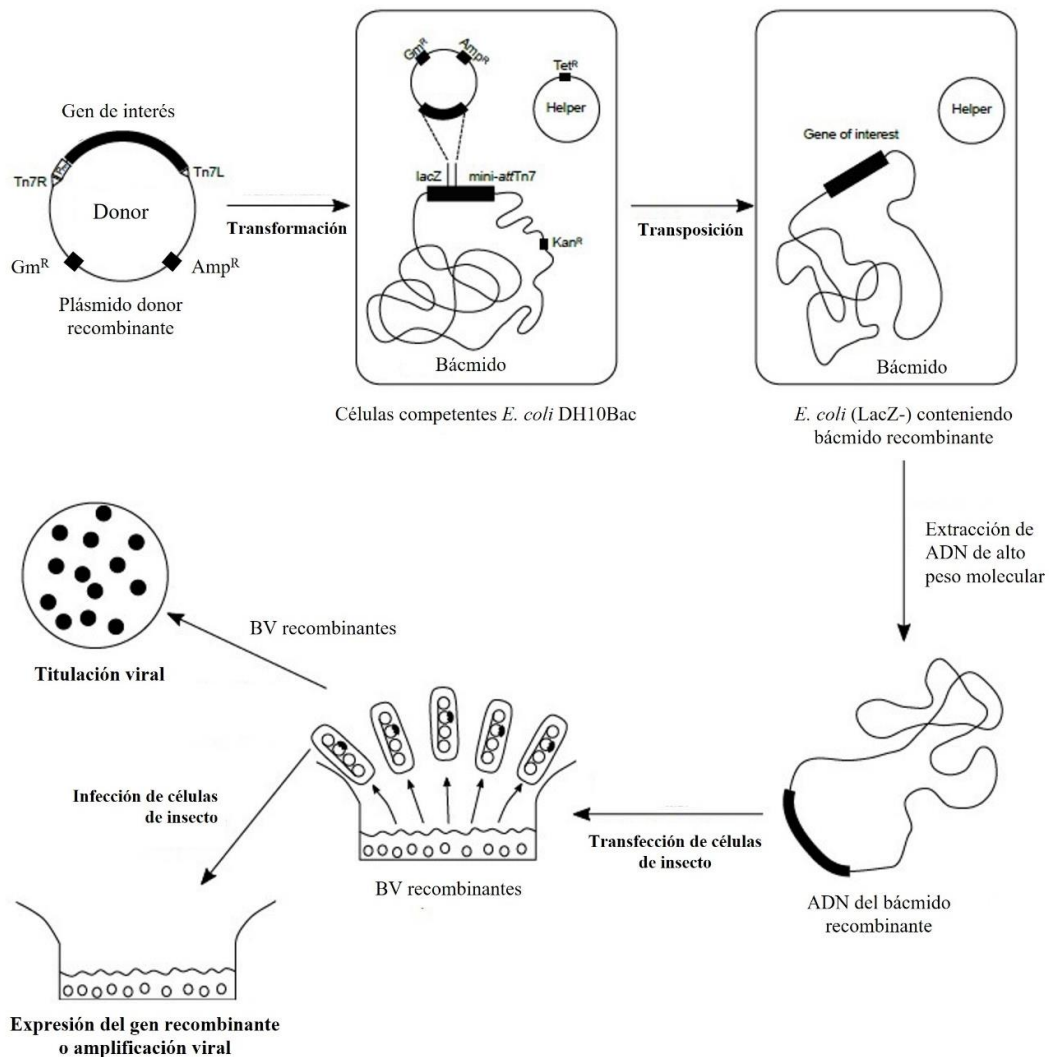


Figura 5. Sistema Bac-to-Bac™ utilizado para la construcción de baculovirus recombinantes y expresión de proteínas en el sistema BEVS. Figura tomado y adaptada del manual “Bac-to-Bac™ Baculovirus Expression System”, Invitrogen LifeTechnologies.

1.2.2.1. Expresión de proteínas recombinantes en cultivos celulares de insecto

La tecnología de cultivos celulares de insectos ha crecido considerablemente durante las dos últimas décadas gracias su aplicación en la producción de proteínas recombinantes. El escalado de procesos de producción de proteínas recombinantes en cultivos celulares presenta las siguientes ventajas: 1) la proteína se expresa en el mismo sistema donde se optimiza su producción, esto reduce la posibilidad de que durante el escalado sufra cambios en sus propiedades, 2) el proceso de purificación de las proteínas secretadas al medio de cultivo libre de suero es más sencillo, y 3) las modificaciones postraduccionales resultan, en teoría, uniformes ya que la línea celular deriva de un único tejido. Sin embargo, la expresión de proteínas recombinantes en cultivo de células presenta una importante desventaja relacionada con los costos de producción. No obstante, en el último tiempo como consecuencia del desarrollo de nuevas formulaciones de medios de cultivos para células de insecto, este sistema se ha vuelto un poco más competitivo en relación con otros sistemas.

Las líneas celulares de insecto solamente pueden ser infectadas por BV. La más frecuentemente utilizada y susceptible a la infección por AcMNPV es Sf9. Esta línea celular, que deriva del tejido ovárico de la larva *S. frugiperda* (Vaughn *et al*, 1977), presenta la capacidad de desarrollarse tanto en cultivos en monocapa como en suspensión y pueden ser transferidas de una a otra forma de cultivo sin adaptación previa. Las líneas celulares son de crecimiento infinito y la densidad y viabilidad celular dependen de la composición del medio (Potter *et al*, 1995). Al ser genéticamente estables pueden calificarse sólo una vez con respecto a su pureza, bioseguridad y alta productividad.

A diferencia de la mayoría de las líneas de células de mamífero, las células de insecto no son susceptibles a inhibición por contacto y pueden rescatarse células viables suspendidas en el sobrenadante de cultivo cuando las densidades celulares son altas. Además, no requieren del uso de tripsina para resuspender las monocapas. Las monocapas de células viables saludables observadas al microscopio invertido revelan células de contornos bien definidos de forma redondeada cuyo tiempo de duplicación bajo condiciones ideales oscila entre 18 a 24 horas. El escalado del sistema puede lograrse fácilmente propagando células en biorreactores de gran capacidad, alcanzando altas densidades de cultivos celulares, comparando con células de mamífero. Estas características tornan

atractivo al sistema para su aplicación a mayor escala. Además, se obtienen altas concentraciones de proteína, ya que se han reportado hasta 30% de las proteínas totales o niveles de g/l (Demain y Vaishnav, 2009).

Para el crecimiento de las células de insecto se diseñaron medios de cultivo basados en la característica de la hemolinfa con el objetivo de permitir el crecimiento celular, la producción de baculovirus y la expresión de proteínas recombinantes. Los nutrientes requeridos por las células de insecto presentan diferencias respecto a los requerimientos de las células de vertebrados. El medio debe contener colesterol, dado que las células de insecto son incapaces de realizar esteroidogénesis (Schlaeger, 1996), altos niveles de aminoácidos (Grace, 1962) y una cantidad inusual de ácidos orgánicos (Wyatt, 1961). El medio es más ácido (pH 6,2–6,9) que el utilizado para células de vertebrado. El pH se debe regular con un buffer de sodio-fosfato y por lo tanto no se requiere CO₂ para el cultivo (Schlaeger, 1996). La temperatura óptima para la propagación de las células de insecto es de 27 °C.

Hay tres formulaciones básicas de medios de cultivo (Grace's Insect Medium, TNM-FH, TC-100 y IPL-41) que en general son suplementados con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Martínez Solís *et al*, 2019). El SFB es esencial ya que contiene factores de crecimiento para el desarrollo de células eucariotas. Este protege a las células del estrés provocado por fuerzas hidrodinámicas y por la acumulación de componentes tóxicos. De todos modos, su utilización también conlleva una serie de desventajas: 1) su adición representa el 50% del costo total del medio de cultivo, 2) su calidad puede variar de lote en lote, 3) sus componentes afectan el crecimiento celular y la replicación viral, y 4) su presencia dificulta el *downstream processing* de las proteínas recombinantes secretadas al medio de cultivo. Si bien se han desarrollado medios de cultivo libres de suero como Sf900TM II SFM (GIBCO), se lo continúa suplementando con 1% SFB ya que las células se encuentran en un estado metabólico más favorable para la expresión de proteínas recombinantes (Schlaeger, 1992; Mengual Gómez *et al*, 2010). También suelen adicionarse a los medios de cultivo soluciones antibióticas-antimicóticas para minimizar el riesgo de contaminación.

1.2.2.2. Procesamiento postraduccionaL de proteínas expresadas en baculovirus

El sistema de expresión de baculovirus se ha utilizado ampliamente debido a su capacidad para plegar, procesar, transportar y sintetizar proteínas similares a otras eucariotas superiores dado la naturaleza eucariota de las células de insecto (O'Reilly *et al*, 1992). Esto conduce a que las proteínas recombinantes expresadas en células de insecto a menudo sean biológicamente activas de manera similar a las células eucariotas superiores. Las células de insecto son capaces de realizar modificaciones como O-glicosilación y N-glicosilación además de otras tales como fosforilación, acetilación, carboximetilación, prenilación y amidación.

La ruta de N-glicosilación en mamíferos y en insectos es similar, pero no idéntica. Aunque la estructura inicial de N-glicosilación añadida a la proteína y las reacciones preliminares de recorte son similares entre insectos y células de mamíferos, las reacciones de procesamiento subsiguientes difieren significativamente.

Tanto en insectos como en mamíferos, el complejo de N-glicano inicial se añade a los residuos de asparagina en el retículo endoplásmico o aparato de Golgi. Este suceso normalmente implica la adición de un precursor de glicano preensamblado compuesto por dos residuos de N-Acetilglucosamina (NAG) unidos a un complejo ramificado de moléculas de manosa con una rama más extendida por la adición de moléculas de glucosa (Figura 6A). A continuación, este complejo se procesa mediante la adición o eliminación de diferentes moléculas de carbohidratos por la actividad de glicosidasas y manosidasas, que eliminan moléculas de glucosa y manosa, respectivamente (Figura 6B) (Miller *et al*, 1983), y glicosilaminotransferasas, involucradas en la adición de un residuo NAG (Figura 6C). El agregado de dicho residuo NAG al *core* se puede realizar en posición α -1,3 o α -1,6 dependiendo de la línea celular de insecto utilizada. Mientras que la línea celular Tn-5 agrega el residuo en posición α -1,3, la línea celular Sf9 lo hace en posición α -1,6. Este punto es importante a la hora de desarrollar proteínas recombinantes con objetivos clínicos debido a que la proteína debe presentar el agregado de fucosa en posición α -1,6 al igual que lo realizan las células de mamíferos, de lo contrario, se corre el riesgo de que el individuo tratado con la proteína recombinante desarrolle una respuesta inmune frente a la presencia de una modificación postraduccionaL foránea (Rendie *et al*, 2008; Altmann, 2007).

Naturalmente, las células de insecto presentan muy poca actividad galactosiltransferasa y sialiltransferasas resultando incapaces de incluir residuos de galactosa o ácido siálico (Altmann *et al*, 1995). Tal motivo representa una limitación del sistema. Mientras que los eucariotas superiores, como los mamíferos, tienen N-glicanos complejos con residuos de ácido siálico en sus extremos por acción de siasiltransferasas (Figura 6F), los producidos en el sistema de baculovirus tienen una cadena lateral más simple que termina en residuos de manosa con la adición de 1–3 residuos de fucosa por acción de fucosiltransferasas (Figura 6E).

Debido a la limitación del sistema en cuanto a las glicosilaciones, se han desarrollado nuevas líneas celulares transgénicas que incorporan genes de mamíferos que codifican enzimas implicadas en la producción de modificaciones de glucanos (Rendie *et al*, 2008; Palmberger *et al*, 2012).

Muchas proteínas secretadas tienen un péptido señal en el extremo amino que es clivado durante la traslocación. Las células de insecto son capaces de reconocer diferentes péptidos señal nativos de proteínas de secreción ya sea de plantas o vertebrados (King y Posee, 1992). Además, las proteínas individuales pueden ser ensambladas en estructuras de orden superior a través de la formación de puentes disulfuro (Sokolenko *et al*, 2012).

Es importante considerar que, en etapas tardías de la infección, es posible que las modificaciones postraduccionales no sean totalmente eficientes. Esto se debe a que durante la infección se produce el apagado de genes endógenos del huésped, mientras se produce una elevada expresión de proteínas virales (Miller *et al*, 1986).

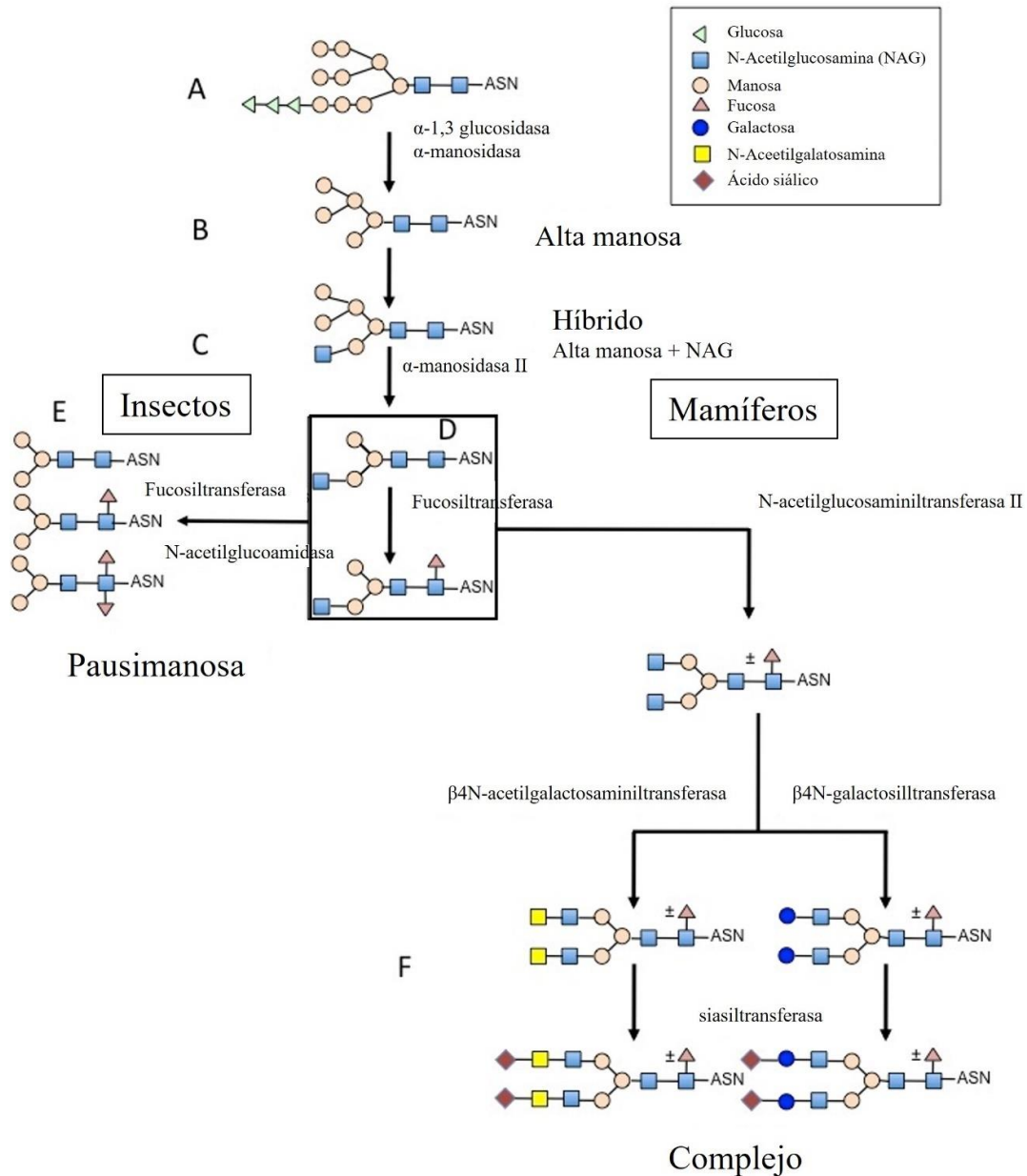


Figura 6. Vías de N-glicosilación producidas en células de insecto y de mamíferos. Los procesos en los dos sistemas poseen intermediarios en común, pero la glicosilación lograda en insectos es mucho más simple que en mamíferos. Tomada y adaptada de Rorhmann (2019).

1.2.2.3. Aplicaciones biotecnológicas del sistema baculovirus

El sistema baculovirus-células de insecto está siendo uno de los sistemas de expresión más utilizados en el campo de la biotecnología para la producción de proteínas, *virus*

like-particles (VLP), *display* de proteínas y desarrollo de vacunas, terapia génica, ingeniería de tejido y *gene delivery* (Kost *et al*, 2005; Wang *et al*, 2006; Xu *et al*, 2012). Actualmente, existen nueve productos con licencia en el mercado de la medicina humana y veterinaria (Tabla 1) (Palomares *et al*, 2015; Van Oers *et al*, 2015; Walsh, 2018; Tanaka, 2012).

Los pasos necesarios para la obtención de una proteína recombinante por el sistema baculovirus puede llevar poco tiempo, lo cual es especialmente útil en casos de pandemia como la de 2009 H1N1 o gripe porcina, donde puede generarse una vacuna en sólo 45 días (Cox y Hashimoto, 2011). Esta última característica representa una gran ventaja frente a la utilización de células de mamífero (Cox, 2004). En el contexto actual de pandemia por COVID-19, se ha utilizado con éxito el sistema baculovirus para la producción de la proteína S del SARS-CoV-2, como inmunógeno en la vacuna desarrollada por Sanofi-GSK. La vacuna de Novavax es otro ejemplo donde se utilizó el sistema baculovirus exitosamente para afrontar el contexto actual de pandemia (Tian *et al*, 2021). El antígeno de esta vacuna, que consiste en la proteína S completa expresada en células de insectos Sf9 en combinación con el adyuvante Matrix-M™, demostró ser efectiva para inducir la producción de altos títulos de anticuerpos anti-S y fuertes respuestas multifuncionales de células T y B en pruebas realizadas en ratones y primates (Tian *et al*, 2021). La vacuna Novavax se encuentra actualmente en fase clínica III, y ya se ha verificado la seguridad y su eficacia (Jhaveri, 2021).

Tabla 1. Biológicos aprobados por FDA o EMA, producidos con BEVS.

Producto	Proteína	Aplicación	Año de lanzamiento (Compañía)	Línea celular
Porcilis pesti	Glicoproteína E2	Vacuna subunidades gripe porcina	1998 (MSD)	Sf21
Bayovac CSF E2/Advasure*	Glicoproteína E2	Vacuna subunidades gripe porcina	2001 (Bayer/Pfizer)	Sf9
Virbagen Omega	IFN ω felino	Tratamiento Parvovirus canina, Retrovirus felinas(b)	2002 (Virbac)	(Larvas de <i>Bombyx mori</i>)
Interdog(a)	IFN γ canino	Tratamiento Dermatitis canina atópica	2005 (Toray)	(Larvas de <i>Bombyx mori</i>)

Circumvent PCV	ORF2 Circovirus porcino	Vacuna VLPs circovirus porcino tipo 2	2005 (MSD)	Sf9
Cervarix	Proteína L1 HPV (serotipos 16 y 18)	Vacuna cáncer cervical en niñas	2007 (GSK)	High Five®
Ingelvac CircoFLEX	ORF2 Circovirus porcino	Vacuna VLPs circovirus porcino tipo 2	2008 (Boehringer)	expresSF+®(c)
Porcilis PCV	ORF2 Circovirus porcino	Vacuna VLPs circovirus porcino tipo 2	2009 (MSD)	Sf9
Provenge*	PAP / GM-CSF	Inmunoterapia cáncer prostático	2010 (Dendreon)	Sf21
Glybera	Vector AAV + LPL	Terapia génica deficiencia LPL	2012 (UniQure)	expresSF+®
Best H5	HA influenza A aviar	Vacuna gripe aviar H5N1	2012 (Boehringer)	expresSF+®
Flublok	HA influenza (H1, H3 y B)	Vacuna trivalente anual gripe humana	2013 (Protein Sciences)	expresSF+®

*Bayovac CSF E2 y Provenge han sido discontinuadas. (a) Interdog es un interferón (IFN) canino aprobado para su uso en Japón. La misma empresa comercializa también Intercat, IFN felino aprobado para su uso en Japón, producto análogo al *Virbagen Omega*®. (b) Retrovirostis felinas = Virus de la Inmunodeficiencia Felina, Virus de la Leucemia Felina. (c) expresSF+® es una línea celular derivada de *Sf9*, propiedad de Protein Sciences Corporation. Referencias: AAV, vector virus adeno- asociado; CSF, Fiebre Porcina Clásica; HA, Hemaglutinina; HPV, Virus del Palpiloma Humano; LPL, lipoprotein lipasa; PAP/GM-CSF, Fosfatasa Ácida Prostática unida a Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos/Macrófagos; PCV, Circovirus Porcino.

1.3. Dominio de unión al receptor de la proteína Spike del SARS-CoV-2

En diciembre de 2019, se detectaron casos de neumonía atípica en la región de Wuhan de la República Popular China (Zhu *et al*, 2020). El agente causal, llamado SARS-CoV-2, es un tipo de coronavirus que causa un síndrome respiratorio agudo severo. Solo 3 meses después de su identificación, el virus se expandió a nivel mundial y la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró al SARS-CoV-2 como una enfermedad pandémica. Para mayo del 2021, el SARS-CoV-2 había infectado a más de 153 millones de personas y había causado más de 3,2 millones de muertes en todo el mundo (<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>). Esta situación tuvo un impacto grave en la salud humana e

impulsó con urgencia a muchas empresas e institutos públicos de investigación a concentrar sus esfuerzos en el desarrollo de vacunas, tratamientos y herramientas de diagnóstico eficaces.

Los coronavirus son virus de ARN simple cadena de sentido positivo (+ssRNA) no segmentados con envoltura (Schoeman y Fielding, 2019). El genoma del SARS-CoV-2, que se secuenció recientemente, es de aproximadamente 29,9 kb (Lu *et al*, 2020) y contiene cuatro ORF para proteínas estructurales (Zeng *et al*, 2004): la proteína de membrana (M), esencial para el ensamblaje y la gemación; la proteína de la envoltura (E), también involucrada en el ensamblaje; la proteína Spike (S), responsable de la entrada viral y la fusión de membranas; y la proteína de la nucleocápside (N). Durante la infección, la proteína S se comporta como el principal determinante antigénico y objetivo de los anticuerpos neutralizantes, siendo su dominio de unión al receptor (RBD) la región donde se concentran la mayoría de los sitios para el reconocimiento de anticuerpos neutralizantes.

Debido a su importante papel en la entrada del SARS-CoV-2 en la célula huésped, S es la proteína más estudiada de este virus (Li *et al*, 2003; Li *et al*, 2005; Li, 2016). Esta proteína glicosilada transmembrana de 1273 aminoácidos está compuesta por dos subunidades funcionales (Figura 7A): S1, responsable de la unión al receptor en la célula huésped, y S2, responsable de fusionar las membranas del virus y la célula huésped. La subunidad S1 consta del dominio N-terminal (NTD) y el RBD, y la subunidad S2 contiene el péptido de fusión (FP), la secuencia de repetición heptapéptido 1 (HR1), la HR2, el dominio transmembrana (TM) y la cola citoplásmica (CT). Entre las subunidades S1 y S2 se encuentra el sitio de escisión de proteasa S1/S2. Durante la infección viral, las proteasas de las células diana activan la proteína S escindiéndola en el sitio S1/S2 (Bertram *et al*, 2013), que es necesario para activar el dominio de fusión de la membrana después de la entrada del virus en las células diana (Hoffmann *et al*, 2020).

En el estado nativo, la proteína S trimérica del SARS-CoV-2 presenta una conformación de prefusión metaestable (Figura 7B). En dicho estado el dominio RBD está oculto dentro del resto de la proteína (estado cerrado) y para que pueda interactuar con el receptor objetivo, enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2), el dominio RBD debe estar expuesto (estado abierto) (Figura 7C). Una vez que el virus interactúa con la célula huésped, se produce un reordenamiento estructural extenso de la proteína que permite que

el virus se fusione con la membrana de la célula huésped (Shang *et al*, 2020; Lan *et al*, 2020; Watanabe *et al*, 2020).

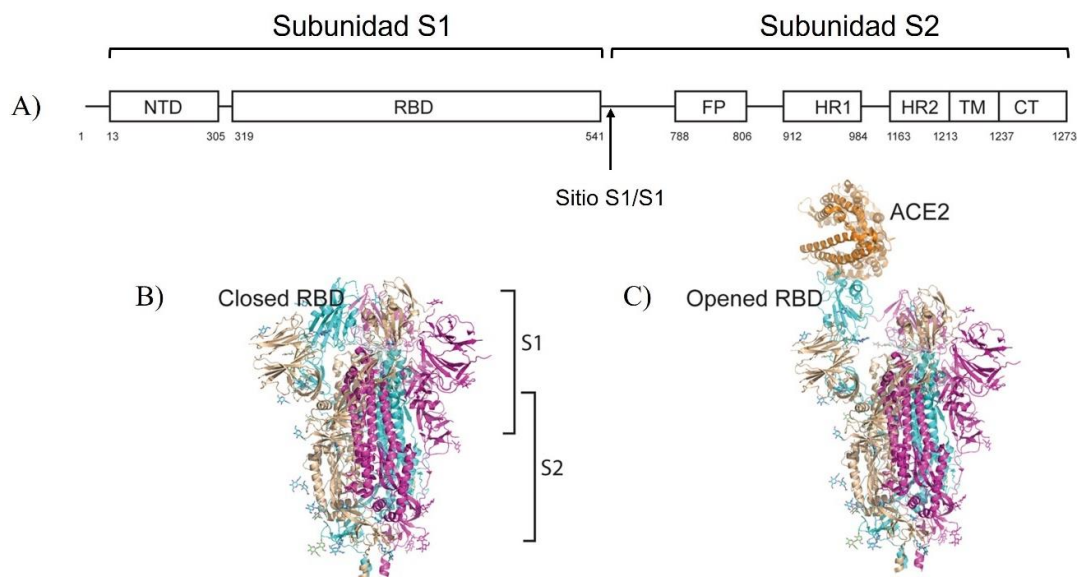


Figura 7. Estructura de la proteína S del SARS-CoV-2. A) Representación esquemática de la conformación de la proteína S del SARS-CoV-2. B) Estado inactivo (cerrado) de la proteína S con el dominio RBD oculto. C) La proteína S se une a ACE2 cuando RBD se encuentra expuesto. Tomada y adaptada de Huang *et al* (2020).

Los residuos 319–541 de S1 corresponden al RBD, que se une con alta afinidad al receptor ACE2, ubicado en la superficie externa de la membrana celular y que actúa como receptor del SARS-CoV-2, ya que media la fusión del virus a la membrana celular (Walls *et al*, 2020; Sanyal *et al*, 2020). RBD tiene un PM secuencial de 27 kDa, nueve residuos de cisteína, de los cuales ocho forman enlaces disulfuro, y dos sitios de N-glicosilación (N331 y N343). Los restos de glicanos son esenciales para el correcto plegado, estabilidad y su inmunogenicidad (Gran *et al*, 2020; Casalino *et al*, 2020). La proteína glicosilada alcanza un PM de 35 kDa. RBD no es un dominio proteico globular, sino que tiene una lámina beta central retorcida antiparalela formada por cinco hebras decoradas con elementos de estructura secundaria (hélices y hebras cortas) y bucles (Lan *et al*, 2020).

Para enfrentar casos de pandemia, es fundamental disponer de plataformas tecnológicas que nos permitan reaccionar rápidamente y ofrecer soluciones en diferentes frentes. Se han implementado varias plataformas para la producción recombinante de

inmunógenos y reactivos del SARS-CoV-2 para el desarrollo de vacunas, terapéuticos y ensayos diagnóstico. El dominio intracelular rico en cisteínas de la proteína S sufre numerosas modificaciones postraduccionales que, si bien son estrictamente necesarias para la funcionalidad de la proteína en el ciclo infectivo natural del virus, son innecesarias para su uso como antígeno y su presencia disminuye considerablemente el rendimiento de obtención recombinante. Por ello, la producción de la proteína S se basó en una construcción a la cual se le eliminó el dominio transmembrana e intracelular (Hsieh *et al*, 2020). En virtud de la complejidad estructural de la proteína S, los métodos para su producción se centraron principalmente en el uso de líneas celulares de mamíferos. Sin embargo, los rendimientos alcanzados en este sistema no fueron muy elevados y exigía grandes volúmenes de cultivos celulares, por lo que los esfuerzos se concentraron en expresar solo su dominio RBD (Stadbauer *et al*, 2020).

RBD es un ejemplo de dominio de proteína desafiante para expresar en sistemas heterólogos debido a su topología compleja. Si bien *E. coli* es un sistema rentable para la expresión de muchas proteínas recombinantes, en este caso no es adecuado para la producción de RBD debido a su requisito de formación de enlaces disulfuro y glicosilación para su expresión y plegamiento adecuados. Por esta razón, el RBD generalmente se expresa en sistemas eucariotas. Es de gran importancia que el proceso producción y purificación de RBD sea de bajo costo y altamente eficiente, ya que se usa ampliamente para el desarrollo de pruebas serológicas e inmunógeno, tanto para la producción de sueros inmunes animales como para el desarrollo de vacunas (Yang *et al*, 2020).

Villafañe *et al* (2021) reportó la expresión del dominio RBD utilizando un sistema fácil y barato de expresión episomal en células de mamífero con un rendimiento de 10 mg/l de proteína recombinante. También se ha reportado expresión de RBD en el sistema de células de mamífero HEK-293T bien establecido y en el sistema rentable y fácilmente escalable de la levadura *Pichia pastoris* (Argentinian AntiCovid Consortium, 2020), siendo sus respectivos rendimientos aproximados 5 y 10–13 mg/l de medio de cultivo a escala laboratorio. Ambos sistemas produjeron polipéptidos solubles y correctamente plegados. Según lo reportado, la producción de RBD en *Pichia pastoris* en biorreactor alcanzó un rendimiento de 45 mg/l. Sin embargo, la RBD expresada en levaduras se presentaba como isoformas a causa de una glicosilación heterogénea. La presencia de glicanos de alta manosa en las proteínas recombinantes expresadas en levaduras es una

desventaja comparativamente con otros sistemas eucariotas. También hay reportes de expresión de RBD recombinante en plantas, específicamente en *Nicotina benthamiana*. En este sistema en particular, el rendimiento de RBD obtenido mediante expresión transitoria en *N. benthamiana* que reporta Shin *et al* (2021) fue bajo y se observó una alta proporción de homodímeros. Dadas las características de RBD, el sistema BEVS es una opción viable para su producción a mayor escala. Sin embargo, Amanat *et al* (2020) reportó altos rendimientos de RBD (aproximadamente 25–50 mg/l de cultivo) en células de mamífero Expi293F, pero bajos (aproximadamente 1,5 mg/l de cultivo) en células de insecto.

En el contexto de esta pandemia, no se ha descrito un proceso de producción del dominio RBD en células de insecto con un rendimiento comparable al obtenido en células de mamífero y levaduras.

En términos generales, las células de insecto ofrecen un entorno eucariota que proporciona una modificación postraducciona adecuada, pero no suficientemente sofisticado como para producir N-glicoproteínas de tipo humano (Fabre *et al*, 2020). Gracias al avance de las técnicas de ingeniería genética el perfil de N-glicosilación se ha logrado mejorar mediante el desarrollo de nuevas líneas celulares de insectos y vectores virales capaces de producir glicosiltransferasa humana (Palmberger *et al*, 2013; Maghodia *et al*, 2021). Además, para incrementar el rendimiento y la estabilidad de la proteína a expresar se han incorporado al vector viral nuevos promotores quiméricos (polhpSeL, polhpB2, pB2p10) y otros elementos (López-Vidal *et al*, 2013; Martínez-Solís *et al*, 2019). Todas estas herramientas pueden implementarse en los procesos para elevar la productividad del sistema BEVS.

1.4. Purificación de proteínas recombinantes

En biotecnología, los procesos de recuperación y purificación de productos biológicos, también conocido como *downstream processing*, son un área muy importante dentro de los bioprocesos de producción de proteínas recombinantes de interés. El costo de producción de proteínas está fuertemente influenciado por el costo del proceso de purificación.

La cromatografía es una técnica de alta resolución utilizada en las últimas etapas del proceso de producción de proteínas. Dentro, la cromatografía de afinidad permite la separación de proteínas en base a interacciones reversibles entre una proteína (o un grupo

de proteínas) y un ligando específico acoplado covalentemente a una matriz cromatográfica. El ligando debe tener especificidad por la molécula blanco, sin embargo, esa interacción (electroestática, hidrofóbica) debe ser reversible permitiendo la recuperación de las proteínas en su estado activo. Se pueden utilizar como ligandos metales o lectinas, entre otros. Las etiquetas de polihistidinas, son ampliamente utilizadas para la purificación de proteínas recombinantes mediante cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) debido a que es infrecuente encontrar en las proteínas nativas del huésped residuos de histidinas superficiales, especialmente en procariontas. El grupo imidazol de los residuos de histidina se une a los metales de transición, como el Ni, con alta afinidad.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

El propósito general del presente trabajo fue diseñar un proceso de producción y purificación del Dominio de Unión al Receptor (RBD) de la proteína Spike del SARS-CoV-2 en insectos.

2.2. Objetivos específicos

- Amplificar la secuencia nucleotídica que codifica para RBD y clonarla en el vector de expresión bajo el promotor quimera polhpSeL y la señal de secreción GP64.
- Construir el baculovirus recombinante y obtener un stock viral de alto título.
- Expresar el antígeno recombinante RBD en células de insecto y optimizar los parámetros de infección para maximizar el rendimiento.
- Purificar la proteína RBD recombinante por Cromatografía de Afinidad de Iones Metálicos Inmovilizados. Establecer las condiciones operativas de trabajo para maximizar el grado de pureza y rendimiento.
- Analizar la inmunorreactividad del antígeno recombinante RBD obtenido.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Clonado de la secuencia de RBD en el vector pAcGP67-B para la obtención del plásmido recombinante pAcGP67-RBD

3.1.1. Obtención de la secuencia de RBD

Se obtuvo la secuencia de RBD (residuos de la proteína Spike entre las bases 319 y 541) (Anexo B) mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como templado el gen de Spike (NCBI Wuhan-Hu-1 S protein, GenBank: QHD43416.1) de 3888 pb, que fue sintetizado por GenScript (Piscataway, NJ, Estados Unidos). La secuencia se encontraba previamente optimizada en el uso de codones para insectos, y clonada en el vector pFastBactTM Dual (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA) entre los sitios de restricción BamHI y HindIII (Promega, Madison, USA). La amplificación de la secuencia de RBD se realizó utilizando un par de oligonucleótidos específicos diseñados para tal fin. Además, se utilizó la ADN polimerasa *EasyPFU* (TransGen Biotech Co., Haidian District, Beijing, China) de alta fidelidad. Se diseñó un oligonucleótido *forward*, Pfw RBD-BamHI (Tabla 5, Anexo A), que hibridaba con el extremo 5' de la secuencia de RBD y agregaba el sitio de restricción de la enzima BamHI (5'-GGATCC-3'), y otro oligonucleótido *reverse*, Prev RBD-EcoRI (Tabla 5, Anexo A), que hibridaba con el extremo 5' de la secuencia de RBD y agregaba una secuencia que codifica para una etiqueta o *tag* de purificación de 6 residuos de histidinas (His), el codón de terminación de la transcripción TAA y el sitio de restricción de la enzima EcoRI (5'-GAATTC-3').

La reacción de PCR se realizó con los componentes que se mencionan a continuación y sus concentraciones en la mezcla de reacción final fueron: 0,3 mM de cada uno de los dNTP), 100 ng de templado, 2,5 U de la ADN polimerasa *EasyPFU*, buffer *EasyPFU* 1X, 200 μM de cada uno de los oligonucleótidos y se llevó a un volumen final de 50 μl con agua libre de nucleasas. Además, se realizó un control negativo de la PCR donde se reemplazó el templado por agua libre de nucleasas. El programa de PCR utilizado se muestra en la Tabla 2. En todas las PCR realizadas durante esta Tesis se utilizó el mismo protocolo y programa de PCR, siendo el tiempo de extensión el único parámetro que se modificó según la secuencia que se buscaba amplificar y la ADN polimerasa utilizada.

Tabla 2. Programa de PCR utilizado para la amplificación de la secuencia de RBD.

Temperatura (°C)	Tiempo	Nombre de la etapa	
94	5 minutos	Desnaturalización inicial	} 30 ciclos
94	30 segundos	Desnaturalización	
58	30 segundos	<i>Annealing</i>	
72	2 minutos	Extensión	
72	5 minutos	Extensión final	

Finalmente, el producto de PCR, que fue denominado RBDhis, se verificó mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V), según la visualización de una banda de 708 pb, al comparar con el marcador de tamaño molecular *Trans 2K Plus II DNA marker* (TransGen Biotech Co.). La banda correspondiente a RBDhis fue purificada utilizando el kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Cytiva* (GE Healthcare, Chicago, Illinois, Estados Unidos).

3.1.2. Obtención del plásmido pAcGP67-B

Para la primera etapa de clonado se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α transformada con el vector pAcGP67-B (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, USA) (Figura 8, Anexo C). La purificación del plásmido se realizó a partir de 5 ml de cultivo de *E. coli* DH5 α crecidas durante 16 horas a 37 °C en medio Luria-Bertani, LB (5 g/l triptona, 5 g/l levadura, 10 g/l NaCl) con 50 μ g/ml de ampicilina en agitación constante a 200 rpm. Pasado el tiempo de incubación, las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 12000 rpm durante 5 minutos y el plásmido fue purificado utilizando el kit comercial *EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit* de TransGen Biotech Co. (Haidian District, Beijing, China) según indicaciones del fabricante y fue resuspendido en 50 μ l de agua libre de nucleasas. Se verificó la presencia y el tamaño del plásmido en un gel de agarosa 1% (P/V), según la visualización de una banda de 9765 pb, al comparar con el marcador de tamaño molecular *Trans 2K Plus II DNA marker*.

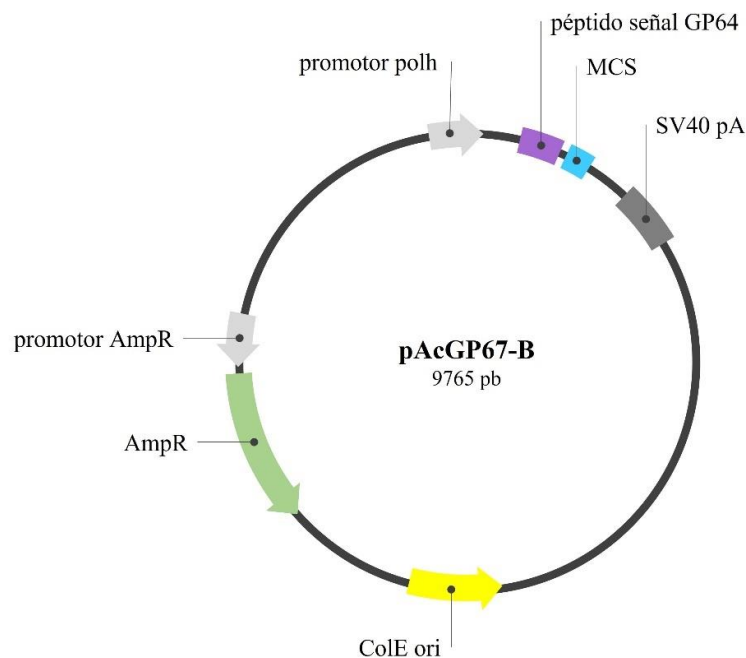


Figura 8. Representación esquemática del vector pAcGP67-B.

3.1.3. Doble digestión de RBDhis y de pAcGP67-B

El plásmido y el producto de PCR purificado fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI a 37 °C durante 2 horas en buffer E 10X en un volumen final de 20 µl. Tras el periodo de incubación, las digestiones fueron purificadas utilizando el kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Cytiva* y posteriormente cuantificadas en un gel de agarosa 1% (P/V) en presencia del marcador de peso molecular de EcoRI/HindIII λ (0,05 µg/µl) (Promega). Además, las muestras fueron cuantificadas por espectrometría utilizando el equipo NanoDrop™ Lite (ThermoFisher).

3.1.4. Ligación

El fragmento a clonar (inserto) y el vector, ambos digeridos, fueron ligados utilizando una relación de masa 1:3 (vector:inserto). La reacción fue llevada a cabo en buffer provisto por proveedor con 3 U de T4 ligasa (Promega) durante 16 horas a 24 °C en un volumen final de 10 µl. Se realizó un control negativo de la ligación donde en la mezcla de reacción no se incluyó el inserto.

3.1.5. Preparación de células ultracompetentes por el método químico

A partir de un cultivo de *E. coli* DH5 α en medio LB crecido durante 16 horas a 37 °C en agitación a 200 rpm, se realizó una dilución 1:100 en medio fresco. El nuevo cultivo bacteriano se incubó en iguales condiciones y se siguió su crecimiento mediante la medición de la densidad óptica en 600 nm a cada hora. Cuando se alcanzó una densidad de 0,6, el cultivo fue centrifugado 10 minutos a 2.500 rpm y 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y el pellet fue resuspendido en 2 ml de buffer de transformación I (KOAc 30 mM, MnCl₂ 50 mM, KCl 100 mM, CaCl₂ 10 mM, 15% glicerol). Luego la solución fue centrifugada 10 minutos a 2.500 rpm y 4 °C. Nuevamente el sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 2 ml de buffer de transformación II (MOPS 100 mM pH 7, CaCl₂ 75 mM, KCl 10 mM, glicerol 15%). Por último, las células ultracompetentes fueron alícuotadas de a 100 μ l en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

3.1.6. Transformación de *E. coli* DH5 α competentes con el vector recombinante pAcGP67-RBDhis

Una vez realizada la reacción de ligación entre la secuencia correspondiente a RBDhis y el vector de transferencia pAcGP67-B, se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5 α ultracompetentes con la construcción obtenida: pAcGP67-RBDhis (Figura 9).

En primer lugar, se descongeló una alícuota de *E. coli* DH5 α competentes. Luego a 100 μ L de suspensión de bacterias se le agregó los 10 μ L del producto de la ligación y se incubó en hielo durante 40 minutos. Cumplido ese tiempo, se realizó el *shock* térmico a 42 °C durante 90 segundos y se incubó 5 minutos en hielo. Luego, se agregó 1 ml de medio LB y se incubó 1 hora a 37 °C en agitación a 200 rpm para permitir la recuperación de las bacterias. Tras la incubación, se sedimentaron las bacterias por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos y se descartó el medio dejando sólo 100 μ L para resuspender el pellet celular. Finalmente, se realizó la siembra en placas con medio LB agar suplementado con ampicilina (100 μ g/ml) para seleccionar los clones transformados y se dejaron crecer 16 horas a 37 °C. El mismo protocolo se utilizó para una transformación control,

que consistía en transformar bacterias *E. coli* DH5 α competentes con una reacción de ligación que contenía únicamente vector digerido.

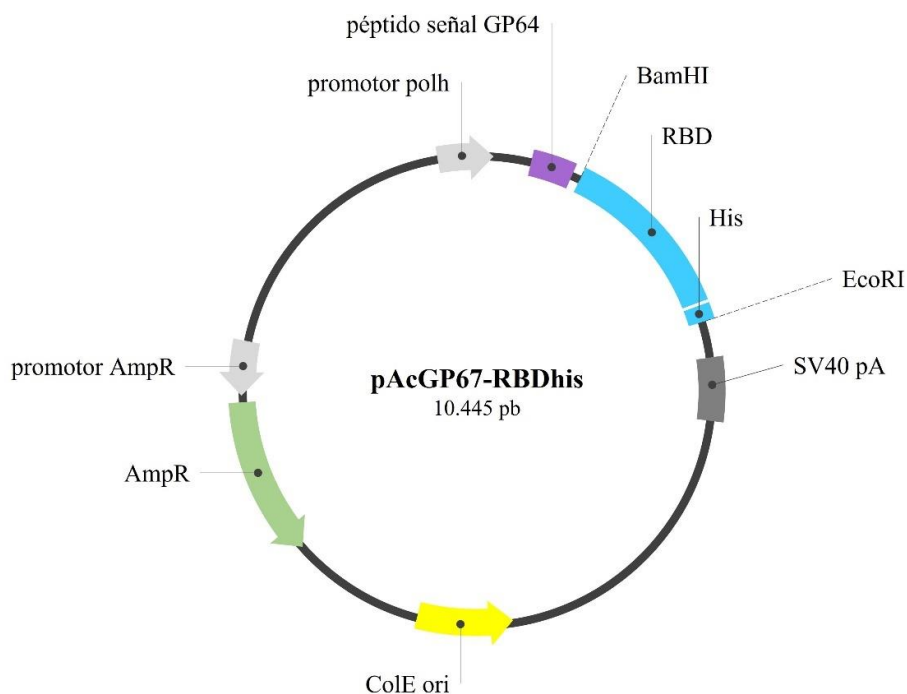


Figura 9. Representación esquemática del vector pAcGP67-RBDhis.

3.1.7. Análisis de colonias

Los clones positivos fueron confirmados e identificados por medio de la técnica de PCR *Colony*. Para ello, se seleccionaron algunas colonias que fueron estriadas en una nueva placa de LB con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$) y a partir de cada una de las estrías se tomó una muestra que fue resuspendida en 50 μl de agua estéril. Luego, las muestras fueron incubadas durante 5 minutos a 99 $^{\circ}\text{C}$ y, centrifugada a 12000 rpm. Posteriormente se tomaron 2 μl de cada muestra para realizar una PCR utilizando la Taq polimerasa *EasyTaq* (TransGen Biotech Co.) según lo indicado en la sección 3.1.1. El tiempo de extensión establecido para amplificar RBDhis fue de 1 minuto. Se utilizaron para la PCR un par de oligonucleótidos específicos que hibridaban en el inserto (Pfw RBD-BamHI y Prev RBD-EcoRI) y alternativamente unos que hibridaban en el vector, que fueron denominados como Pfw GP67-universal y Prev GP67-universal (Tabla 5, Anexo A). Los

oligonucleótidos universal sentido y universal antisentido hibridan hacia el 5' del codón de iniciación ATG y 60 pb río abajo del codón de terminación del vector, respectivamente. Además, se utilizó como control de PCR cuando se utilizaron los oligonucleótidos GP67-universales un vector pAcGP67-B que tenía clonado el gen no relacionado de esfingomielinasa (pAcGP67-Sph) y cuando se utilizó los oligonucleótidos RBD, el vector pFastBac™ Dual que contenía el gen de Spike (pFBD-Spike) utilizado en la sección 3.1.1. para obtener la secuencia de RBD.

Dos de los clones bacterianos que resultaron positivos fueron seleccionados y cultivados en medio LB líquido suplementado con 100 µg/ml de ampicilina en un volumen final de 6 ml. La incubación se realizó en agitación a 200 rpm durante 16 horas a 37 °C. Un ml de bacterias se criopreservó a -80 °C luego del agregado de glicerol en una concentración final de 15% (V/V), mientras que, el volumen restante (5 ml) se utilizó para la purificación del ADN plasmídico con el kit comercial de purificación de plásmido *EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit*. Finalmente, los plásmidos purificados fueron enviados para su secuenciación al Servicio de Secuenciación del INTA de Castelar (Buenos Aires, Argentina) utilizando los oligonucleótidos Pfw GP67-universal y Prev GP67-universal.

3.2. Clonado de gpRBDhis en pFBD-polhpSeL-x para la obtención del vector donador pFBD-polhpSeL-gpRBDhis

3.2.1. Obtención de la secuencia de gpRBDhis

La secuencia gpRBDhis de 816 pb se obtuvo mediante una PCR utilizando como templado el vector pAcGP67-RBDhis, que se construyó previamente en la sección 3.1., y un par de oligonucleótidos específicos diseñados para tal fin. Además, se utilizó la ADN polimerasa *EasyPFU* de alta fidelidad. El oligonucleótido *forward*, Pfw GP64-EcoRI (Tabla 5, Anexo A), hibridaba con el extremo 5' de la señal de secreción GP64 situada río arriba de la secuencia de RBD, de tal modo que se incorpore dicha secuencia en la amplificación, y agregaba el sitio de restricción de la enzima EcoRI, y el oligonucleótido *reverse* Prev RBD-EcoRI, el mismo que se utilizó en la sección 3.1.1.

El protocolo y programa de la PCR fue el indicado en sección 3.1.1. para la obtención de la secuencia de RBD (Tabla 2). El tiempo de extensión establecido para amplificar gpRBDhis fue de 1 minuto. Por último, los productos de PCR se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V), según la visualización de una banda de 837 pb, al comparar con el marcador de tamaño molecular 2K Plus II ADN y se purificó la banda correspondiente mediante el kit comercial de purificación de bandas de gel *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Cytiva*.

3.2.2. Obtención del plásmido donador pFBD-polhpSeL-X

Para la etapa de clonado se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 α , que se encontraba transformada con el vector de transferencia pFastBac-polhpSeL-X de 6172 pb (Figura 10), desarrollado previamente por nuestro laboratorio (Targovnik *et al*, 2019). Este vector, que deriva del vector comercial pFastBacTM Dual, posee dos promotores y dos sitios de clonado posibilitando el clonado simultaneo de dos genes de interés. Por un lado, bajo el promotor p10 tiene clonado el gen EGFP (del inglés *Enhanced Green Fluorescent Protein*), que posibilita el monitoreo por fluorescencia de las infecciones virales en etapas posteriores (sección 3.3.4.). Por otro lado, el promotor original de poliedrina (polh) presente en el vector comercial, ha sido remplazado por el promotor quimera polhpSeL, un novedoso y muy fuerte promotor desarrollado por Martínez-Solís *et al* (2016), que surge de la fusión del promotor del gen de poliedrina del AcMNPV y una porción del promotor del orf46 del SeMNPV (Virus de la Poliedrosis Nuclear Múltiple de *Spodoptera exigua*). Bajo este promotor será clonado la secuencia gpRBDhis.

La purificación del plásmido se realizó siguiendo los pasos descriptos en la sección 3.1.2. Se verificó la presencia y el tamaño del plásmido también mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) al comparar con el marcador de tamaño molecular *Trans 2K Plus II DNA marker*.

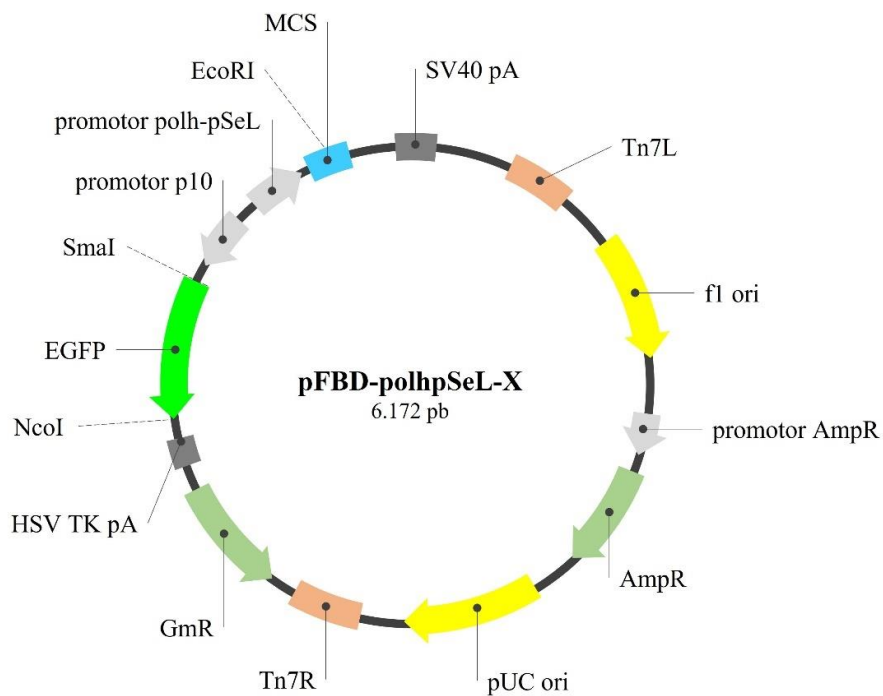


Figura 10. Representación esquemática del vector pFBD-polhpSeL-X.

3.2.3. Digestión simple de gpRBDhis y de pFBD-polhpSeL-X

Tanto el plásmido como el producto de PCR purificado fueron digeridos con las enzimas de restricción EcoRI a 37 °C durante 2 horas en buffer H 10X en un volumen final de 20 µl. Dado que el clonado no era direccionado, después de la digestión del vector se prosiguió con la desfosforilación del vector a fin de reducir su autoligación. Ésta se logró incubando el vector con 0,05 U de fosfatasa alcalina CIAP (Promega) a 37 °C durante dos intervalos de 30 minutos en buffer CIAP 10X en un volumen final de 50 µl. Luego del primer intervalo se adicionó 0,05 U extra de CIAP.

Finalmente, el inserto y el vector fueron purificadas utilizando el kit comercial *Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit Cytiva* y cuantificados en un gel de agarosa 1% (P/V) en presencia del marcador de peso molecular de EcoRI/HindIII λ (0,05 µg/µl). Además, las muestras fueron cuantificadas por espectrometría utilizando el equipo NanoDrop™ Lite.

3.2.4. Ligación

La ligación del fragmento por clonar y el vector, ambos digeridos, se realizó siguiendo lo indicado en la sección 3.1.4.

3.2.5. Transformación de *E. coli* DH5 competentes con el vector recombinante pFBD-polhpSeL-gpRBDhis

Una vez realizada la reacción de ligación entre la secuencia de gpRBDhis y el vector donador pFastBac-polhpSeL-X, se procedió a transformar bacterias *E. coli* DH5 α ultracompetentes con la construcción obtenida: pFBD-polhpSeL-gpRBDhis (Figura 11). La transformación de *E. coli* DH5 α ultracompetentes se realizó de igual manera que se describe en la sección 3.1.6.

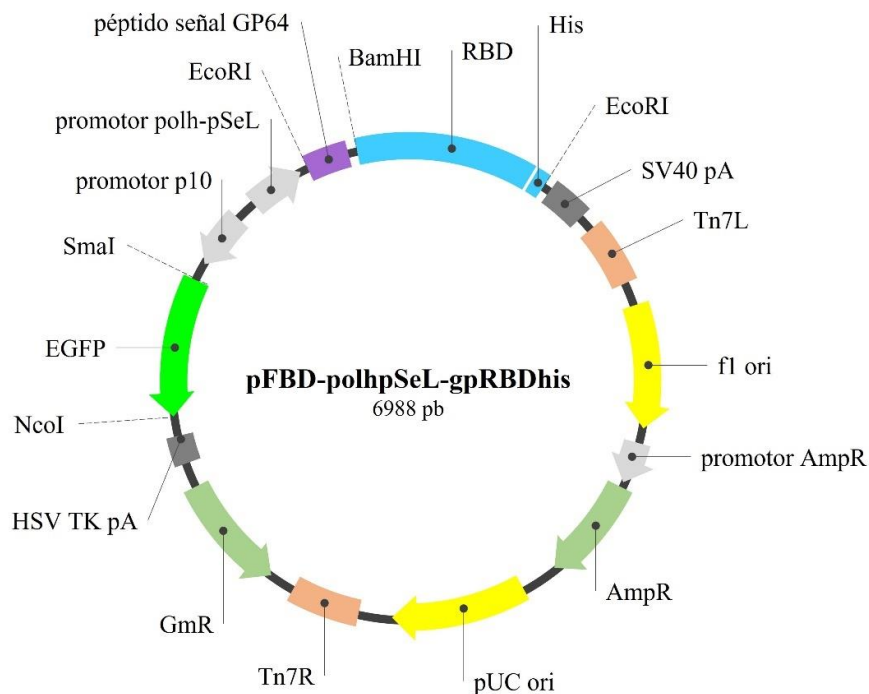


Figura 11. Representación esquemática del vector pFBD-polhpSeL-gpRBDhis.

3.2.6. Análisis de colonias

Los clones positivos fueron confirmados e identificados por medio de la técnica de PCR *Colony* siguiendo el mismo protocolo descrito en la sección 3.1.7. Dado que el clonado fue no direccionado en EcoRI, se utilizó el oligonucleótido universal sentido, Pfw pFBD-universal (Tabla 2, Anexo A), que hibrida específicamente sobre el promotor de polhpSeL, y el Prev RBD-EcoRI, que hibrida sobre la secuencia de RBD. Se utilizó este juego de oligonucleótidos a modo de determinar correctamente la orientación del cassette de expresión. El tiempo de extensión establecido fue de 1 minuto y 30 segundos.

Dos de los clones bacterianos que resultaron positivos fueron seleccionados y cultivados tal como se indicó en la sección 3.1.7. Posteriormente, el vector pFBD-polhpSeL-gpRBDhis fue purificado utilizando nuevamente el kit *EasyPure® Plasmid MiniPrep Kit*. Un ml de bacterias se criopreservó a -80 °C luego del agregado de glicerol en una concentración final de 15% (V/V). Finalmente, los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar al Servicio de Secuenciación del INTA de Castelar utilizando los oligonucleótidos Pfw pFBD-universal y Prev pFBD-universal para corroborar que la secuencia de gpRBDhis se haya clonado con la orientación correcta y presente la secuencia esperada.

3.3. Obtención del baculovirus recombinante

Para la obtención del baculovirus recombinante se utilizó el sistema comercial Bacto-Bac™ (ThermoFisher) (Figura 5).

3.3.1. Preparación de bacterias competente DH10Bac™

A partir de un cultivo de *E. coli* DH10Bac™ en medio LB crecido durante 16 horas a 37 °C en agitación a 250 rpm, se realizó una dilución 1:100 en medio fresco. El nuevo cultivo bacteriano se incubó en iguales condiciones y se siguió su crecimiento mediante la medición de la densidad óptica en 600 nm a cada hora. Cuando se alcanzó una densidad de 0,6, el cultivo fue incubado en hielo durante 15 minutos y centrifugado a 3300 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Luego el sobrenadante fue descartado, y el pellet fue resuspendido en 10 ml de ClCa₂ 100 mM. La solución fue incubada durante 1 hora y 30 minutos en hielo y posteriormente centrifugada nuevamente a 3300 rpm durante 10 minutos a

4 °C. El sobrenadante fue descartado y el pellet resuspendido en 12 ml de ClCa_2 100 mM con 10% de glicerol. Finalmente, las células competentes fueron alicuotadas en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml estériles de a 100 μl y almacenadas a -80 °C hasta su uso.

3.3.2. Generación y purificación del báculo recombinante

Se transformaron 100 μL de una suspensión de bacterias *E. coli* DH10Bac™ (ThermoFisher) con 0,5 μg de pFBD-polhpSeL-gpRBDhis, tal como se describió previamente para la transformación de *E. coli* DH5 α (sección 3.1.6.), pero con una incubación a 37 °C durante 4 horas en agitación constante a 225 rpm. Tras la incubación, se sembraron 10 μL de la suspensión bacteriana en placas de LB agar, conteniendo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Bluo-Gal y 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IPTG (TransGen Biotech Co) y se incubaron a 37 °C por 48 horas.

Transcurridas las 48 horas se pueden observar colonias blancas y azules. Las colonias blancas corresponden a aquellas donde se produjo la transposición del cassette de expresión, presente en el plásmido pFBD-polhpSeL-gpRBDhis, en el sitio mini-attTn7 del báculo. Estas colonias son blancas dado que el evento de transposición interrumpe el factor de complementación LacZ α anulando la producción de β -galactosidasa y, en consecuencia, la hidrólisis del Bluo-Gal en un producto de color azul.

Algunas de las colonias blancas, consideradas positivas, se reestriaron en una nueva placa LB agar, conteniendo kanamicina, gentamicina, Bluo-Gal e IPTG, para la confirmación del fenotipo. La confirmación de la presencia de la secuencia de interés se realizó por *Colony* PCR desde las nuevas estrías utilizando los oligonucleótidos Pfw M13 y Prev M13 (Tabla 2, Anexo A), que hibridan con secuencias del báculo flanqueantes al sitio de transposición. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las mencionadas en la sección 3.1.1. y el tiempo de elongación a 72 °C fue de 5 minutos. Posteriormente, los productos de PCR se verificaron mediante una electroforesis en gel de agarosa 1% (P/V) esperando visualizar una banda de 4829 pb.

Los clones positivos se crecieron en medio líquido LB-kanamicina/gentamicina para la posterior purificación del báculo obtenido por una minipreparación de alto peso molecular. Para ello el cultivo bacteriano se centrifugó a 14000 rpm durante 1 minuto y luego el *pellet* celular se resuspendió suavemente en 300 μl de solución 1 [Tris-HCl 15

mM pH 8.0, EDTA 10 mM, 100 µg/ml RNasa (Transgen Biotech Co.)]. Seguidamente se agregó 300 µl de solución 2 [SDS 1% (P/V), NaOH 0,2 N] y se incubó en hielo durante 10 minutos. Pasado el tiempo de incubación, la solución fue centrifugada a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Como resultado de la centrifugación, el sobrenadante obtenido fue transferido a un tubo tipo Eppendorf estéril de 2 ml con 800 µL de isopropanol y mezclado suavemente. Luego de una incubación en hielo durante 10 minutos, la mezcla resultante fue centrifugada a 14000 rpm durante 15 minutos a 20 °C. Posteriormente, el sobrenadante fue descartado y el *pellet* fue lavado con etanol 70% dos veces. Después de cada lavado se centrifugó a 14000 rpm a 20 °C por 5 minutos. El *pellet* se secó a 37 °C durante 20 minutos. Finalmente, el *pellet* fue resuspendido en 40 µL de agua libre de nucleasas y se verificó la presencia del bácmido purificado en un gel de agarosa 1% (P/V).

3.3.3. Cultivo de células de insecto

Las células Sf9 (ThermoFisher) utilizadas en este trabajo se encontraban adaptadas al medio de cultivo Sf900™ II SFM suplementado con 1% (V/V) de SFB (ThermoFisher) y 1% (V/V) de solución antimicótica-antibiótica [10000 U/ml de penicilina, 10000 µg/ml de estreptomycin y 25 µg/ml de anfotericina B (ThermoFisher)]. Los cultivos celulares fueron mantenidos en monocapas en botellas planas T25 (25 cm² de superficie) con 5 ml de medio de cultivo, o bien en botellas T75 (75 cm² de superficie) en 8 ml de medio de cultivo, en una atmósfera controlada a 27 °C.

Las células fueron subcultivadas cada 3 o 4 días cuando la monocapa alcanzaba un 100% de confluencia. Para ello, fueron levantadas de la superficie de la botella con golpes suaves y resuspendidas con la ayuda de una pipeta con el fin de evitar la formación de agregados. Finalmente, se tomó una alícuota de 1 ml de la suspensión celular, se la colocó en una botella nueva T25 y se llevó a un volumen final de 5 ml o, alternativamente, se tomó una alícuota de 3 ml, se la colocó en una botella T75 (75 cm² de superficie) y se llevó a un volumen final de 15 ml.

Los cultivos en suspensión se llevaron a cabo en Erlenmeyer autoclavados de 100 ml o 200 ml. El inóculo inicial de células provino de un cultivo en monocapa. Luego las suspensiones fueron llevadas a la estufa a 27 °C y colocadas en agitación constante a 100

rpm. Todos los ensayos se llevaron a cabo utilizando células Sf9 de cultivos en suspensión con una viabilidad del 95–99% y en crecimiento exponencial.

3.3.3.1. Recuento y viabilidad celular

Las células crecidas en monocapas se levantaron a través de golpes suaves sobre la superficie de la botella y mediante una pipeta se resuspendieron las células. En el caso de las células crecidas en suspensión, la resuspensión se logró rotando la botella. Luego, para el recuento celular se tomó una alícuota de la suspensión celular y se la diluyó 1:10 en medio de cultivo. Posteriormente, para la determinación de la viabilidad celular, se agregó el colorante de exclusión azul de tripán 0,4% (ThermoFisher) en una relación 1:25 resuspendiendo cuidadosamente.

El recuento celular se determinó en un microscopio óptico (10X) a partir de una cámara de Neubauer o hemocitómetro, distinguiendo entre células viables (incoloras, refringentes) y no viables (azules). El recuento se realizó en los 4 cuadrantes de cada hemicámara, obteniéndose un promedio de células totales, viables y no viables, que se corrigió por la dilución utilizada, obteniéndose finalmente un valor de células/ml.

3.3.4. Transfección mediada por liposomas

La transfección del bÁcrido purificado en células Sf9 se realizó según lo indicado por el fabricante. Para ello, se prepararon, por un lado, 2 pocillos de una placa de 35 mm con 1×10^6 células Sf9 en 2 ml de medio Sf900™ II SFM libre de suero, y por el otro, dos tubos estériles de 1,5 ml con las soluciones requeridas. En el tubo “A” se mezclaron 100 µl de medio de cultivo sin suero y 4 µl del reactivo CellFECTIN® (ThermoFisher), cuya formulación contiene el lípido catiónico N, NI, NII, NIII-Tetrametil-N, NI, NII, NIII-tetrapalmitil-espermina (TM-TPS) y dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) en agua. En el tubo “B” se mezclaron 100 µl de medio de cultivo sin suero con 1 µg del bÁcrido, que contenía la secuencia de la proteína a expresar. Se transfirió y mezcló suavemente la preparación “B” en “A” y la mezcla resultante fue incubada durante 45 minutos a temperatura ambiente (TA). Finalizado el tiempo de incubación, la mezcla fue llevada a un volumen final de 1 ml con medio Sf900™ II SFM sin suplementar.

Una vez verificada la correcta adherencia de las células, el medio de cultivo presente fue removido y la mezcla de transfección fue inoculada sobre la monocapa de uno de los pocillos. La placa fue incubada durante 4 horas a 27 °C en oscuridad. Luego, el sobrenadante de transfección fue removido y reemplazado por 2 ml de medio de cultivo suplementado con 1% SFB (V/V) y 1% (V/V) de solución antimicótica-antibiótica. El pocillo restante se utilizó como control y no se transfectó.

Tras 4 días de incubación en oscuridad a 27 °C, se colectaron los sobrenadantes y se clarificaron por centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto. La expresión de EGFP permitió comprobar la eficiencia de la recombinación homóloga por monitoreo de la fluorescencia verde del pellet celular bajo el microscopio.

3.3.5. Amplificación del virus recombinante

Para generar el stock baculoviral de trabajo, a partir del sobrenadante de transfección del virus que fue denominado AcgpRBDhis, se realizaron dos ciclos de amplificación hasta la obtención del stock viral de alto título. Para el primer ciclo, a los 4 días posterior a la transfección se recolectó el sobrenadante y se lo clarificó por centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto. Se tomaron 100 µl del sobrenadante de transfección, se llevó a un volumen final de 1 ml con medio de cultivo suplementado y se infectó una botella T25 que contenía 2×10^6 células. Luego, se llevó a un volumen final de 3 ml con medio de cultivo suplementado y se incubó durante 4 días a 27 °C en oscuridad. Transcurrido el periodo de incubación, el sobrenadante de infección fue recolectado, clarificado por centrifugación a 13000 rpm por 1 minuto y guardado a 4 °C protegido de la luz.

Para la segunda amplificación se partió de una monocapa con 1×10^7 células en una botella T75 a la que se agregó 10 µl del sobrenadante de infección de la primera amplificación y, luego se llevó a volumen final de 8 ml con medio de cultivo. Posteriormente, se procedió de igual manera que para la amplificación anterior. Finalmente, el sobrenadante de infección del segundo ciclo fue titulado como se indica en la siguiente sección 3.3.6.

3.3.6. Titulación viral por el método de dilución a punto final (Reed y Muench)

El título del stock viral de trabajo se determinó según el método de dilución a punto final desarrollado por Reed y Muench (O'Reilly *et al*, 1994), en placa de 96 pocillos. En primer lugar, se realizó una dilución seriada al décimo del stock viral con medio Sf900™ II SFM y, luego, cada dilución se diluyó nuevamente al décimo con una suspensión celular a una concentración de 1×10^5 células/ml en 3 ml. De esta manera, se obtuvieron diluciones finales 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} del virus. Finalmente, cada una se sembró en una fila de una placa de 96 pocillos (200 μ L/ pocillo) y se incubó la placa a 27 °C durante 7 días en oscuridad. Se agregó también una fila control conteniendo sólo células Sf9.

Tras 7 días post-infección (dpi) se retiró el medio y la placa se observó al microscopio de fluorescencia. A aquellos pocillos con fluorescencia verde visible, como signo de infección, se les otorgó un score positivo. Luego, la Dosis Infecciosa 50 (DI50), que representa la cantidad de virus requerido para producir efecto citopático observable, como células GFP-positivas, en el 50% de las células, se estimó usando dos diluciones críticas entre las cuales se encontraba el punto final. Primero, la distancia proporcional (PD) de estas diluciones al 50% del punto final se calculó según lo indicado en la siguiente fórmula:

$$PD = \frac{(\% \text{ de pocillos positivos en dilución } >50\%) - 50\%}{(\% \text{ de pocillos positivos en dilución } >50\%) - (\% \text{ de pocillos positivos en dilución } <50\%)}$$

Luego, al factor de dilución mayor al 50% se le restó la PD, para obtener la dilución que produciría 50% de lisis, que es igual al logaritmo de DI50:

$$\log DI50 = (-) \text{ dilución } >50\% - PD$$

Entonces, se calculó DI50 con el antilogaritmo, se corrigió por el volumen empleado para el ensayo (200 μ L), y se obtuvo un valor de ID50/ml. El título se convirtió a Unidades Formadoras de Placa de lisis (UFP)/ml, luego de obtener la DI50 según: UFP/ml = DI50/ml x 0,69, asumiendo una distribución de Poisson donde DI50 es equivalente a 0,69 unidades infectivas (O'Reilly *et al*, 1994).

3.4. Expresión de RBD en cultivos celulares en suspensión

A partir de una suspensión celular en fase de crecimiento exponencial, se prepararon tres matraces Erlenmeyer con 10 ml de cultivo Sf900™ II SFM y una densidad celular de 1×10^6 células/ml. A cada uno de los cultivos se le agregó una concentración diferente de SFB (0%, 1%, 10%). Para ello, las células previamente fueron centrifugadas a 1000 rpm a TA y lavadas con medio Sf900™ II SFM sin suero para luego ser resuspendidas en el medio con la concentración de suero indicada. Cada uno de los cultivos, fueron infectados con el baculovirus recombinante, denominado AcgpRBDhis, a una multiplicidad de infección (MOI) 2. Se dejó un cultivo control que fue infectado con un virus no relacionado (Ac-Sph). Las tres condiciones se incubaron a 27 °C en agitación y cubiertas en papel de aluminio. Se tomaron muestras durante 6 días para realizar una curva de expresión y poder determinar el día óptimo de cosecha y la mejor condición de expresión. El sobrenadante se recuperó y fue centrifugado a 13000 rpm por 2 minutos a TA para separar los restos celulares. Finalmente, las muestras se prepararon con buffer Laemmli para su análisis por SDS-PAGE y posterior Western Blot (sección 3.6.2.).

3.5. Purificación de RBD por IMAC

Se purificó la RBD recombinante a partir de sobrenadantes de cultivos celulares en suspensión de 6 dpi en columnas preempacadas de Ni-NTA (HisTrap HP 1 ml, GE Healthcare). El equipo utilizado para la cromatografía fue el AKTA Purifier (GE Healthcare.). En todo el proceso se trabajó con un flujo constante de 1,0 ml/minuto.

Inicialmente, la matriz fue lavada con 10 volúmenes de columna de agua destilada y luego, equilibrada con 20 volúmenes de buffer de fosfatos 25 mM, NaCl 300 mM, pH 7.4 (buffer de equilibración). Por otro lado, la matriz fue acondicionada con 20 ml de buffer de equilibración utilizando un cassette de diafiltración Pellicon de 10 kDa (Millipore, USA) y una bomba peristáltica (GE Healthcare) a fin de para desalar, cambiar el buffer y concentrar las muestras.

La muestra acondicionada fue sembrada en la columna donde se recolectó la fracción que fue denominada *pass through* (fracción que sale de la columna al sembrar) y luego se continuó con el lavado utilizando buffer de lavado (buffer de fosfatos 25 mM, NaCl 300 mM, pH 8,0, conteniendo 80 mM de imidazol). Finalmente, se eluyó la proteína recombinante por desplazamiento competitivo con imidazol en buffer de elución (buffer de fosfatos 25 mM, NaCl 300 mM, imidazol 500 mM, pH 7.4). La cromatografía fue monitoreada siguiendo la absorbancia en 280 nm. Las fracciones se prepararon con buffer Laemmli y se analizaron tal como se describe, más adelante, en la sección 3.2.6.

3.6. Caracterización de RBD recombinante

3.6.1. Determinación de la concentración de proteínas totales y RBD

El contenido total de proteínas de cada condición de expresión y fracción cromatográfica fue determinado utilizando el método de unión al colorante azul de Coomassie G-250 descrito por Bradford (1976). Se construyó para cada experimento una curva de calibración con una solución patrón de seroalbúmina bovina (SAB, 1 mg/ml). Las muestras convenientemente diluidas fueron ensayadas mezclándolas con 100 μ l de una solución de colorante 1X *Quick Start™ Bradford reagent* (Bio Rad, Hercules, USA), y homogeneizadas llevando el sistema a un volumen final de 0,2 ml con agua destilada. Luego, se incubaron durante 10 minutos a TA y se midió la absorbancia en 595 nm contra un blanco de reactivo. Las concentraciones de las muestras se obtuvieron interpolando la lectura obtenida en la curva estándar, multiplicando por el factor de dilución y promediando los resultados. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Paralelamente la concentración de RBD fue determinada por densitometría en gel. Para ello se realizó un gel SDS-PAGE donde se corrió la muestra purificada de RBD y una curva patrón de BSA (5 μ g–0,3 μ l). El gel fue teñido con Coomassie Blue (sección 3.2.6.2.), escaneado y analizado con el software *ImageJ software* (National Institute of Health, USA).

3.6.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y Western Blot

Los sobrenadantes de cultivo Sf9 de distintos dpi y las fracciones del proceso de purificación se resolvieron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12,5% para realizar una curva de expresión y poder determinar el día óptimo de cosecha y la mejor condición de expresión, y evaluar la pureza y rendimiento, respectivamente. Se emplearon minigeles de 6x9 mm preparados con poliacrilamida al 5% en buffer Tris-HCl 125 mM pH 6,8 en el gel concentrador y en buffer Tris-HCl 373 mM pH 8,8 en el gel de resolución, ambos con SDS al 0,1%. Para la resolución de los geles se utilizó el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad).

Las muestras fueron preparadas en buffer de siembra o Laemmli Buffer 4X [Tris-HCl 125 mM, pH 6,8, SDS 4% (P/V), glicerol 20% (P/V), azul de bromofenol 0,01% (P/V), 2-mercaptoetanol 10% (V/V)]. Antes de la siembra de la muestra, la misma se calentó 5 minutos a 100 °C. También se sembró junto a la muestra un marcador de peso molecular a fin de identificar cada banda según su peso molecular

Una vez sembradas las muestras en el gel, la electroforesis se desarrolló a 90 V/gel hasta que se concentraron las proteínas en el gel concentrador y luego a 120 V/gel, empleando como buffer de corrida Tris-glicina-SDS [(Tris-HCl 25 mM pH 8,8, glicina 190 mM, SDS 0,1% (P/V)]. Los geles se revelaron con Coomassie Blue R-250 [Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (P/V), metanol 50% y ácido acético glacial 10%] o bien se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham™ Protran 0,45 NC, GE Healthcare). Los geles teñidos con la solución de azul de Coomassie R 250 se descoloraron, después de incubar durante 1 hora en agitación, por medio de lavados en una solución de metanol, ácido acético y agua en una relación 3:1:6 hasta observar bandas nítidas sobre un fondo claro correspondientes a las proteínas.

Para la transferencia de las proteínas de los geles a las membranas de nitrocelulosa se armó el cassette de transferencia en el siguiente orden desde el electrodo negativo hacia el positivo: una esponja tipo Scotch Brite (Bio-Rad), un papel de filtro Whatman 3MM, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa, un papel de filtro Whatman 3MM y una esponja del tipo Scotch Brite. El cassette armado se montó dentro de una cuba (Bio-Rad) con buffer de transferencia y un enfriador con hielo y se realizó la transferencia durante una hora a 280 mA. Pasada la hora, se retiraron las membranas de nitrocelulosa

y se la incubó a 4 °C en solución de bloqueo [PBS con leche descremada 3% (P/V), PBS-L] durante 16 horas. Luego se realizaron 3 lavados con PBS-Tween-20 0,05% (V/V) (PBS-T) durante 10 minutos cada uno y se agregó el anticuerpo primario de ratón anti-His (BD Bioscience) en una dilución 1:3000 en PBS-T con leche descremada 1% (P/V). Tras 2 horas de incubación, se repitieron 3 lavados de 10 minutos cada uno con PBS-T y se incubaron las membranas con el anticuerpo secundario de cabra anti-Murino conjugado con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch Laboratories INC, West Grove, PA, USA) en una dilución 1:20000, en PBS-T con leche descremada 1% (P/V) durante 1 hora. Seguidamente se descartó la solución del segundo anticuerpo y lavó 3 veces durante 10 minutos cada uno, se llevó a cabo el revelado de las bandas de interés, por quimioluminiscencia, usando un sustrato quimioluminiscente (Pierce® ECL, ThermoFisher Scientific) y el escáner C-Digit (LI-COR, Bad Homburg, Germany). Todos los pasos de lavado y las incubaciones con anticuerpos se realizaron a TA y en agitación constante.

3.6.3. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

La muestra fue centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm previo a la inyección en un HPLC (Shimadzu, Japón). La resolución se realizó utilizando una columna de fase reversa (RP-HPLC) Bio-Basic C4 (ThermoFisher Scientific) con detección dual a longitudes de onda de 220 nm y 280 nm. Se utilizó un gradiente isocrático por 5 minutos de CN/H₂O/TFA, 10/90/0.1 % (V/V) y luego un gradiente a ACN/TFA 100/0.1% (V/V) en 20 minutos.

3.6.4. Análisis de la presencia de ADN viral en las fracciones cromatográficas

El ADN viral fue extraído a partir de las fracciones cromatográficas utilizando el kit comercial *Prepman Ultra Reagent* (Applied Biosystem™, Foster City, CA). Para ello, se mezclaron cantidades iguales de la fracción a analizar y de reactivo, y la solución resultante fue incubada durante 5 minutos a 100 °C. Luego, la muestra fue centrifugada a 12000 rpm durante 2 minutos y utilizada como templado para realizar una PCR según lo indicado en la sección 3.1.1. Para la PCR se utilizaron utilizando los oligonucleótidos

Pfw pFBD-Universal y Prev pFBD-Universal de orientación sentido y antisentido (Tabla 2, Anexo A), respectivamente. El fragmento esperado contaba de 1076 pb en caso de que las fracciones cromatográficas presentasen ADN viral. Se realizaron los controles positivos y negativos correspondientes.

3.7. Evaluación de la inmunorreactividad de RBD recombinante

Los ensayos para evaluar la inmunorreactividad de RBD fueron realizados por la Dra. Silvina Valdéz del LIE-Instituto de la Inmunidad Humoral (IDEHU), Cátedra de Inmunología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Se le entregó una muestra de RBD recombinante purificada para sensibilizar microplacas en un enzimoimmunoensayo (ELISA) puesto a punto en el laboratorio. Se realizaron ensayos con 15 muestras de sueros humanos normales obtenidos con anterioridad a la pandemia y 15 muestras de suero de pacientes infectados con SARS-CoV-2. Los sueros positivos de pacientes utilizados en el ensayo fueron cedidas por el Biobanco de Enfermedades Infecciosas (BBEI) del Instituto de Investigación Biomédica en Retrovirus y SIDA (INBIRS) y provenían de casos de COVID-19 previamente confirmados por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) en muestras del tracto respiratorio. Además, las muestras fueron previamente determinadas como IgG positivas o IgG negativas para SARS-CoV-2 por el ensayo de ELISA COVIDAR IgG (Laboratorio Lemos S.R.L). También se utilizaron en el ensayo sueros equinos hiperinmunes provenientes de equinos inmunizados con RBD en el INPB-ANLIS que resultaban positivos por COVIDAR IgG (Laboratorio Lemos SRL).

Los resultados fueron calculados como absorbancia específica ($A = \text{Absorbancia media de cada muestra menos la media del blanco de muestra}$), y se expresaron como unidades de desviación estándar: $SDs = (A - A_c) / SD_c$, donde A_c es la absorbancia específica media de los sueros controles normales y SD_c su desviación estándar. El valor de corte del ensayo se estableció en $SD = 5,0$.

La significación estadística se evaluó mediante test t de Student. Los cálculos se realizaron utilizando GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego California, USA www.graphpad.com). Un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Clonado de RBD

4.1.1. Obtención del vector donador pFBD-polhpSeL-gpRBDhis

La obtención del vector donador pFBD-polhpSeL-gpRBDhis (Figura 14) se realizó en dos etapas. En una primera etapa se llevó a cabo el clonado de la secuencia RBDhis en el vector pAcGP67-B con el objetivo de fusionarla a la señal de secreción de origen viral GP64. La secuencia de RBD fue obtenida por PCR a partir de la secuencia que codifica para la proteína Spike completa, clonada en el vector pFBD-Spike, utilizando los oligonucleótidos específicos: Pfw RBD-BamHI y Prev RBD-EcoRI. Los oligonucleótidos fueron diseñados de tal forma de introducir una secuencia que codifique para 6 residuos de histidinas hacia el extremo 3' del gen, además de incorporar los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BamHI y EcoRI en los extremos 5' y 3', respectivamente. Tanto el vector pAcGP67-B de 9765 pb como el inserto RBDhis de 693 fueron digeridos con las enzimas de restricción correspondientes y purificados para su posterior cuantificación, ligación y transformación de bacterias *E. coli* DH5 α (Figura 12).

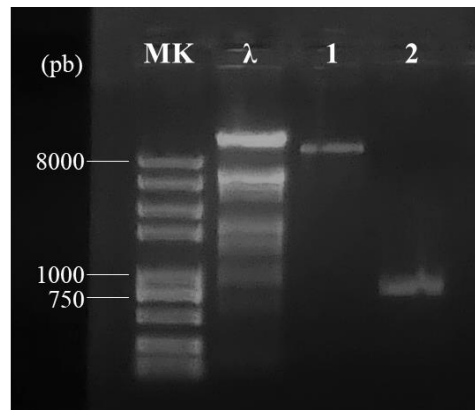


Figura 12. Gel de agarosa 1% del producto de digestión de pAcGP67-B y RBDhis con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y posteriormente purificados. MK y λ : marcador de peso molecular. Calles: 1, pAcGP67-B; 2, RBDhis.

Tras el evento de clonado, el plásmido recombinante, denominado pAcGP67-RBDhis (Figura 9), se purificó y la presencia del inserto se confirmó por PCR *Colony*. En la Figura 13 se observan los resultados obtenidos de la PCR *Colony*. Las bandas observadas

en las calles 2 y 4 corresponden con la esperada de 708 pb y 967 pb, dado que se utilizaron oligonucleótidos específicos del inserto y alternativamente específicos del vector, respectivamente. Se utilizó como control positivo de la PCR el plásmido pFBD-Spike y un vector pAcGP67-B que tenía clonado el gen no relacionado de esfingomielinasa (pAcGP67-Sph). Como se observa en las calles 1 y 3, los pesos esperados fueron 708 pb para el control pFBD-Spike y 1292 pb para el control pAcGP67-Sph.

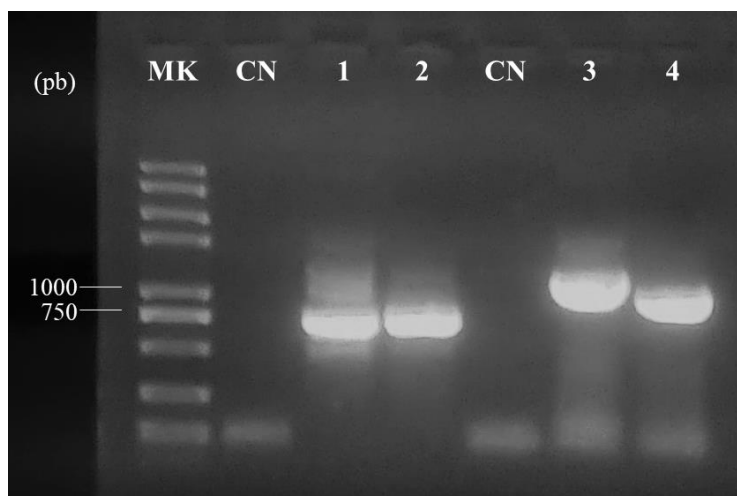


Figura 13. Verificación por PCR Colony del clonado de RBDhis en el vector pAcGP67-B. MK: marcador de peso molecular. CN: control negativo. Calles: 1, PCR de pFBD-Spike con oligonucleótidos específicos del inserto (control positivo); 2, PCR del clon positivo pAcGP67-RBDhis con oligonucleótidos específicos del inserto; 3, PCR de pAcGP67-Sph con oligonucleótidos específicos del vector (control positivo); 4 PCR del clon positivo pAcGP67-RBDhis con oligonucleótidos específicos del vector.

La Figura 14 resume todo el proceso del clonado de RBDhis en pAcGP67-B. El vector fue secuenciado para la confirmación de la secuencia RBDhis y utilizado para la etapa posterior.

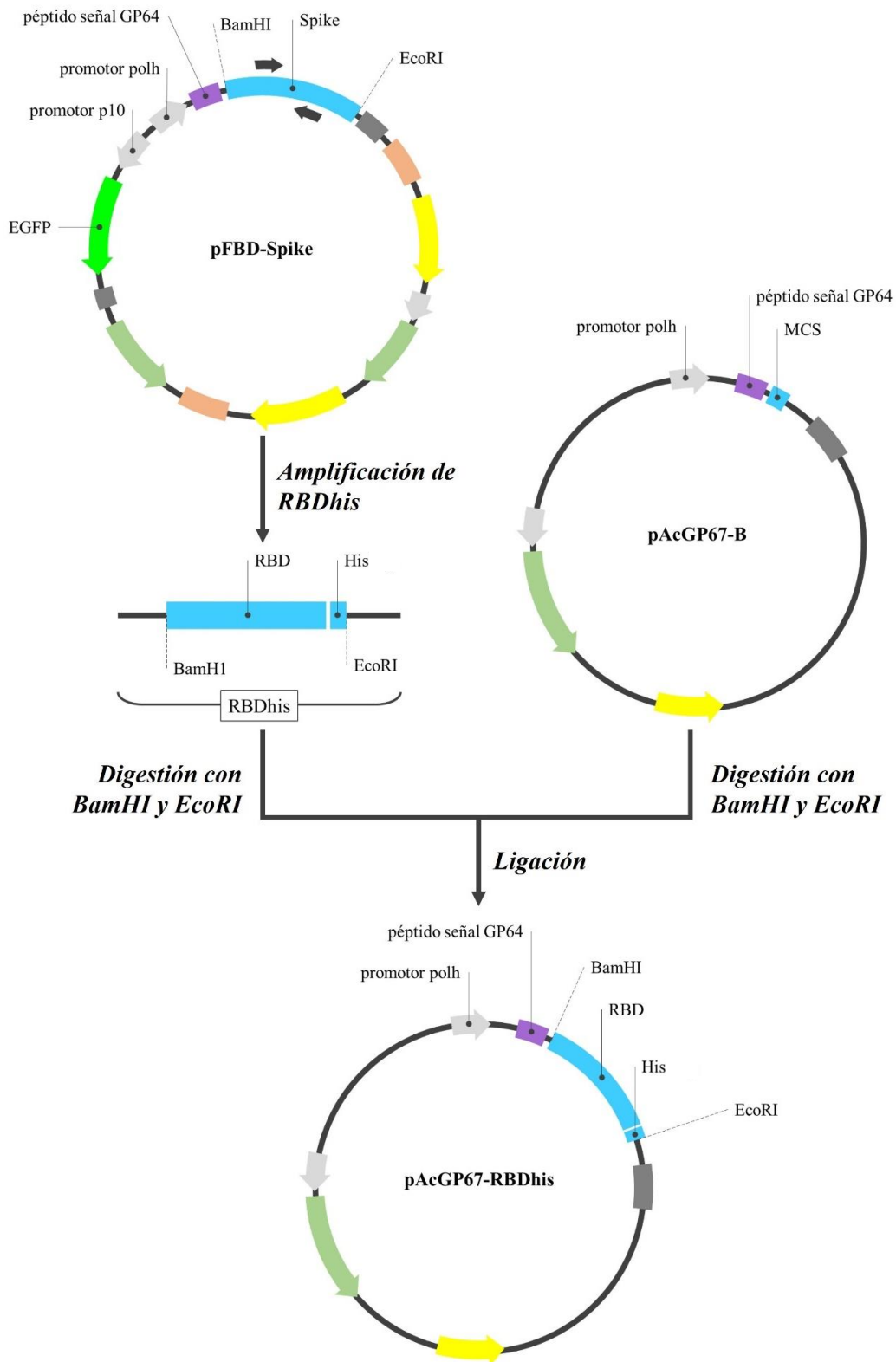


Figura 14. Representación esquemática del clonado de RBDhis en el vector pAcGP67-B para obtener la construcción pAcGP67-RBDhis.

El vector pAcGP67-RBDhis fue utilizado como templado para amplificar específicamente la secuencia que codifica para la RBDhis junto a la secuencia de la señal de secreción GP64 (gpRBDhis). Para tal fin, se utilizó el oligonucleótido Pfw EcoRI-GP64 que fue diseñado de modo tal que se incorpore la secuencia GP64 a la secuencia RBDhis en la amplificación y el sitio de restricción de la enzima EcoRI en el extremo 5' y el oligonucleótido Prev RBD-EcoRI. Para el subclonado en el vector pFBD-polhpSeL-X de 6.276 pb, dicho vector, así como el inserto, gpRBDhis de 837 pb, fueron digeridos con EcoRI y purificados para luego cuantificarlos, ligarlos y transformar bacterias *E. coli* DH5 α con el producto de ligación (Figura 15).

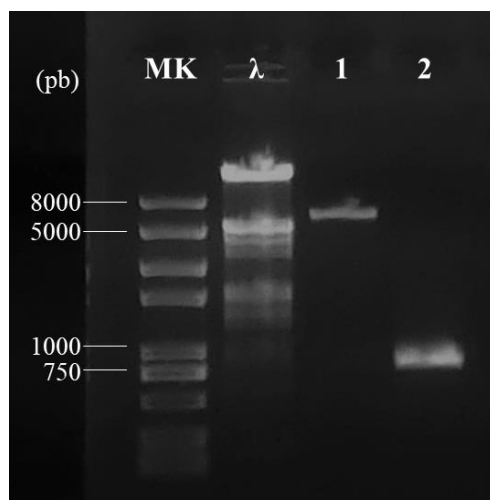


Figura 15. Gel de agarosa del vector pFBD-polhpSeL-X e inserto gpRBDhis digeridos con la enzima de restricción EcoRI y purificados. MK y λ : marcador de peso molecular. Calles: 1, pFastBac-polhpSeL-X; 2, gpRBDhis.

Tras el clonado, el plásmido recombinante, denominado pFBD-polhpSeL-gpRBDhis (Figura 11), se purificó y se confirmó la presencia del inserto por PCR *Colony*. El resultado de la PCR se observa como una banda de 1076 pb en el gel de agarosa de la Figura 16. Se utilizó el oligonucleótido Pfw pFBD-universal, que hibrida específicamente sobre el promotor polhpSeL, y el Prev RBD-EcoRI, que hibrida sobre RBD, a modo de determinar la orientación correcta y con ello confirmar la presencia del inserto de interés.

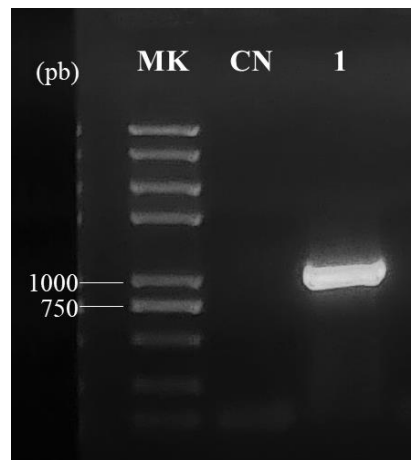


Figura 16. Verificación por PCR Colony del clonado de gpRBDhis en pFBD-polhpSeL-X. MK: marcador de peso molecular. CN: control negativo. Calle 1: PCR del clon positivo.

De esta manera, la secuencia gpRBDhis fue clonada en el vector pFBD-polhpSeL-X dando origen al vector pFBD-polhpSeL-gpRBDhis. La Figura 17 resume todo el proceso del clonado de gpRBDhis en pFBD-polhpSeL-X. El vector fue secuenciado para la confirmación de la secuencia gpRBDhis y utilizado para la generación del baculovirus recombinante: AcgpRBDhis (Figura 21).

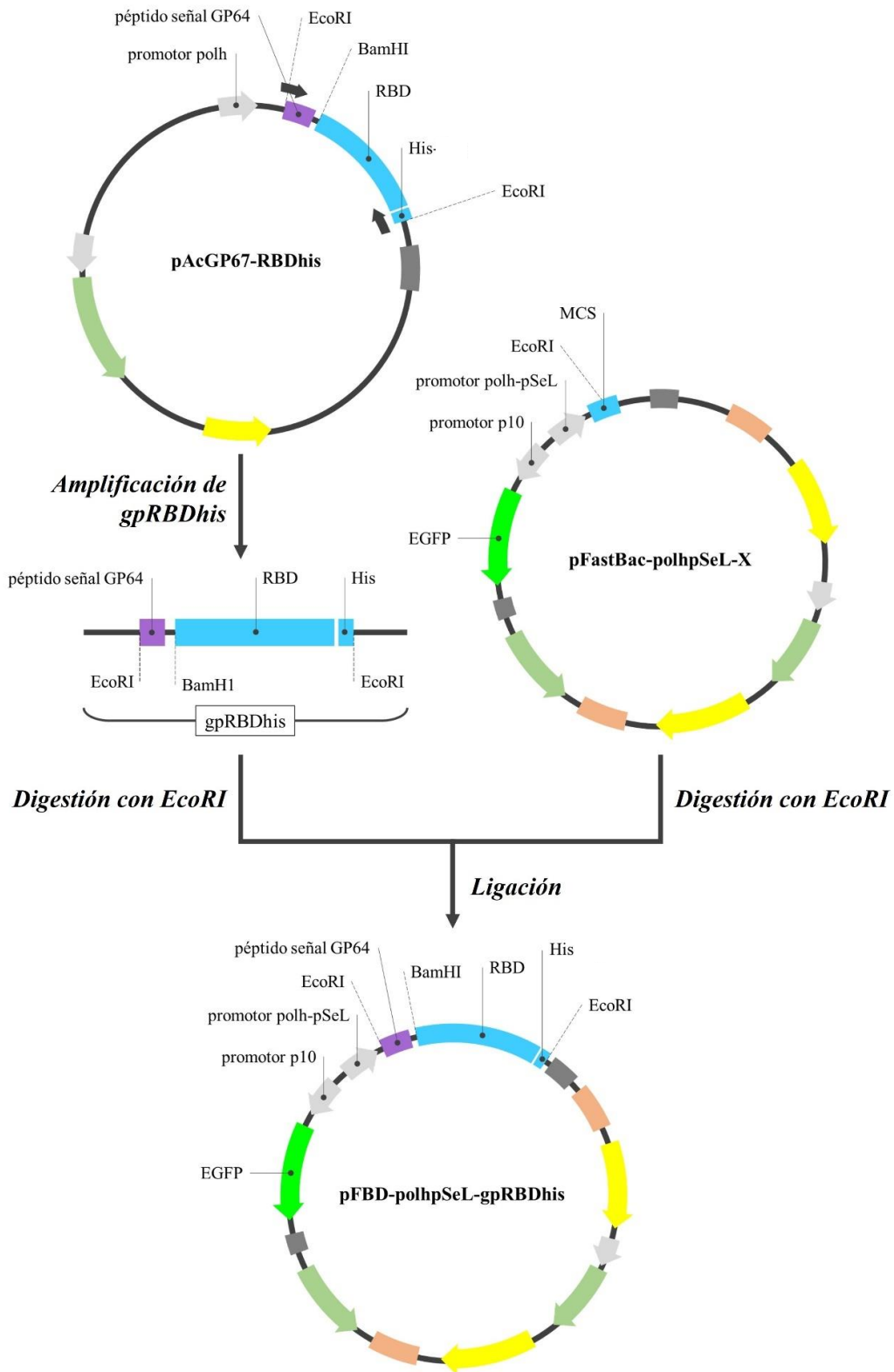


Figura 17. Representación esquemática del clonado de gpRBDhis en el vector pFBD-polhpSeL-X para obtener la construcción pFBD-polhpSeL-gpRBDhis.

4.2. Generación del baculovirus recombinante AcgpRBDhis

Se transformaron bacterias *E. coli* DH10Bac™ con el plásmido de transferencia pFBD-polhpSeL-gpRBDhis. La aparición de colonias blancas en las placas indicó el éxito de la transposición vía Tn7 del cassette de expresión hacia el báculo bacteriano, presente las bacterias *E. coli* DH10bac™, y la consecuente interrupción del factor de complementación LacZ α . Se confirmó el fenotipo transformado con una PCR *Colony* utilizando los oligonucleótidos Pfw M13 y Prev M13 que hibridan con secuencias del báculo flanqueantes al sitio de transposición. La amplificación resultó en una banda de 4829 pb para la colonia blanca y una banda de 273 pb para la colonia azul, como puede observarse en el gel de agarosa obtenido (Figura 18).

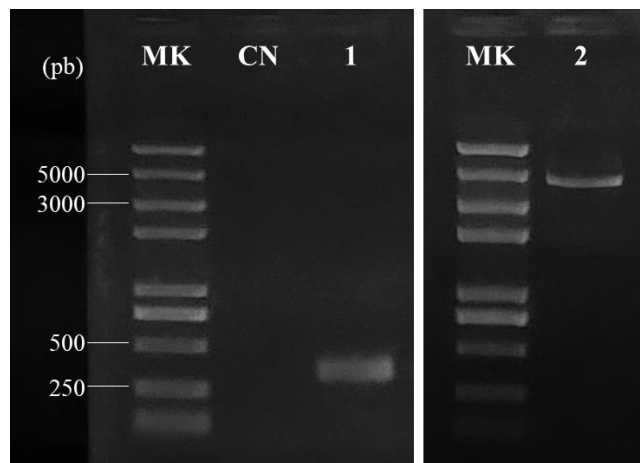


Figura 18. Verificación por PCR de la transposición del cassette de expresión al báculo presente en bacterias *E. coli* DH10Bac™. MK: marcador de peso molecular. CN: control negativo. Calles: 1, PCR de una colonia azul (negativa); 2, PCR de una colonia blanca (positiva).

De esta manera, se confirmó la presencia de gpRBDhis en el báculo. Posteriormente, se purificó el báculo por una extracción de alto peso molecular y la presencia del báculo fue verificada en un gel de agarosa (Figura 19).

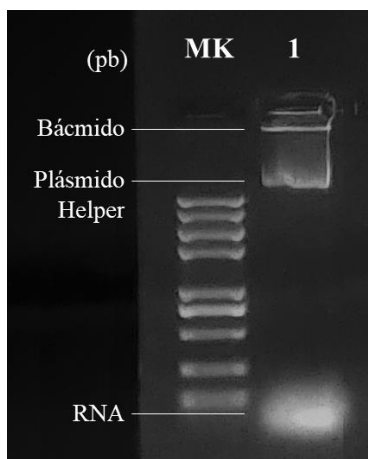


Figura 19. Gel de agarosa 1% de la extracción del báculo. MK: marcador de peso molecular. Calle 1: báculo.

El báculo presenta la totalidad del genoma de AcMNPV, por lo que mantiene la capacidad de formar partículas virales y propagarse en células de insecto. Por ello, se lo utilizó para la transfección de células Sf9 y, así, generar el baculovirus recombinante AcgpRBDhis. El éxito de la transfección se corroboró por microscopía de fluorescencia (Figura 20A), donde la visualización de fluorescencia verde en el pellet celular resultó indicativa de la expresión de GFP, proveniente del báculo recombinante (Figura 21). El sobrenadante clarificado de la transfección, que contenía los baculovirus recombinantes, se utilizó para realizar dos rondas de amplificación viral (Figura 20B), hasta la obtención de un stock de trabajo de alto título: $2,4 \times 10^8$ UFP/ml.

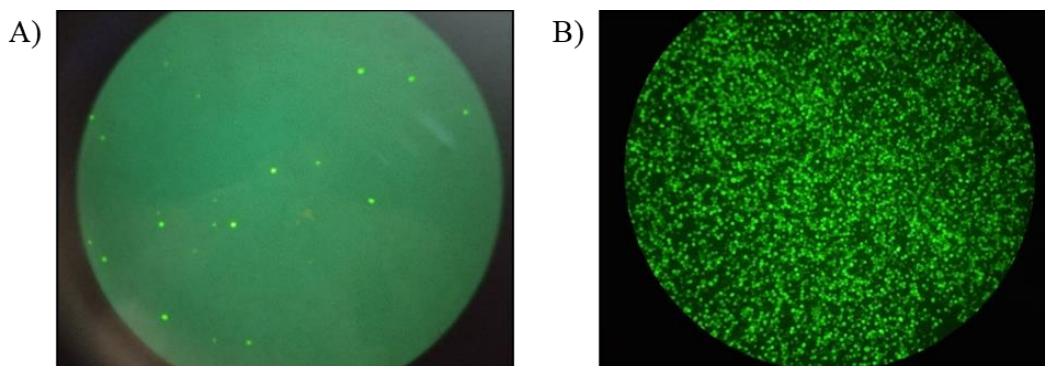


Figura 20. Microfotografías de células Sf9 bajo microscopio de fluorescencia para el monitoreo de la expresión de GFP (40x). A) Células transfectadas con el baculovirus recombinante. B) Segunda ronda de amplificación del baculovirus recombinante.

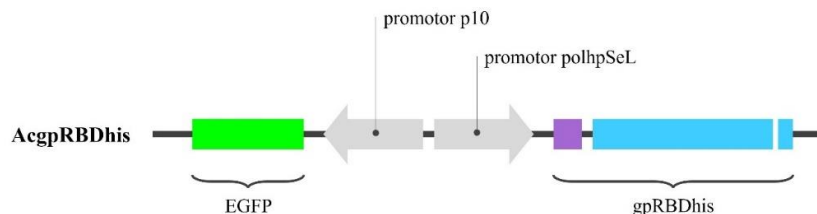


Figura 21. Esquema del baculovirus AcgpRBDhis.

4.3. Expresión de RBD en sobrenadantes de cultivo de células Sf9

Una vez obtenido y titulado el stock de AcgpRBDhis, se realizaron estudios para evaluar el nivel y la cinética de expresión de RBD. En primera instancia se infectó una suspensión de células Sf9 crecidas en medio Sf900™ II SFM suplementado con 1% de SFB con el virus AcgpRBDhis a una MOI 2. Debido al costo del SFB, es interesante estudiar la expresión de proteínas recombinantes en medios libres o bajo contenido de SFB. Es por ello que se ensayó la expresión con 1% SFB que es la condición óptima que tradicionalmente se ha trabajado en nuestro laboratorio.

Las muestras se cosecharon diariamente hasta el dpi 6, separando pellet celular de sobrenadante por centrifugación, y se analizaron mediante Western Blot. Como muestra la Figura 22, fue posible detectar RBD con un peso molecular (PM) aparente de 34 kDa. El PM resultó un 26% superior al PM predicho en forma teórica a partir de la secuencia incluyendo la etiqueta de histidinas (27 kDa). La RBD presenta 2 sitios N de glicosilación en la posición N331 y N343 (Shin *et al*, 2021). Cuando la RBD fue expresada en células de mamíferos, fue demostrado que cuando ambos sitios se encontraban totalmente glicosilados alcanzaba un PM de aproximadamente 35 kDa. (Villafañe *et al*, 2021). Esto sugiere que la RBD producida en el presente trabajo en células de insectos estaría glicosilada correctamente de forma similar a la producida en células de mamíferos y se presenta como un producto homogéneo. Previamente, Argentinian AntiCovid Consortium (2020) obtuvo muy buenos rendimientos cuando expresó la RBD en *P. pastoris*. Sin embargo, la calidad de la proteína obtenida fue inferior ya que no se encontraba homogéneamente glicosilada (Argentinian AntiCovid Consortium, 2020). Es importante remarcar que los N-glicanos cumplen un rol fundamental en el plegado y la actividad biológica de la RBD (Shin *et al*, 2021).

La proteína RBD producida en el presente trabajo se localizó en el sobrenadante de cultivo de Sf9. Esto significa, que el péptido señal GP64, de origen viral, direccionó el tráfico de la proteína recombinante hacia el medio extracelular, con lo cual el péptido señal GP64 funcionó de manera correcta. Se comienza a observar la expresión proteica a partir del dpi 2, llegando a un máximo nivel de expresión aparente a los 4 dpi. Las proteínas recombinantes expresadas y secretadas al medio de cultivo pueden ser susceptibles a la degradación por proteasas liberadas durante la lisis celular que ocurre en etapas tardías de la infección. Además, la lisis masiva de células en cultivo conlleva a la liberación de proteínas intracelulares que complican los procesos de purificación de la proteína de interés. Por lo tanto, estos factores deben tenerse en cuenta a la hora de seleccionar el día de cosecha del producto de interés. En este caso, la RBD no resultó susceptible a la acción de proteasas a tiempos tardíos de la infección y fue posible obtener una proteína homogénea durante toda la cinética de expresión. Es por ello, que, con el objetivo de recuperar la mayor cantidad de proteína recombinante, el día 6 fue el seleccionado para cosechar RBD del sobrenadante de cultivo.

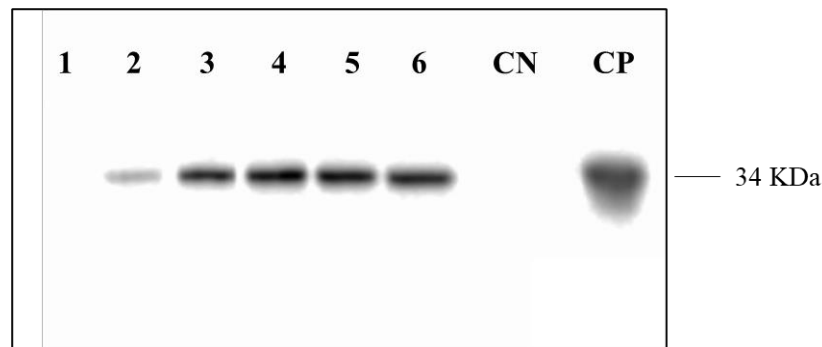


Figura 22. Cinética de expresión de RBD en células Sf9 crecidas en medio de cultivo suplementado con 1% de SFB. Calles: 1-6, sobrenadante de expresión en células Sf9 a los 1-6 dpi respectivamente, respectivamente; CN, control negativo; CP, control positivo.

4.4. Purificación de RBD de sobrenadantes de cultivos celulares por IMAC

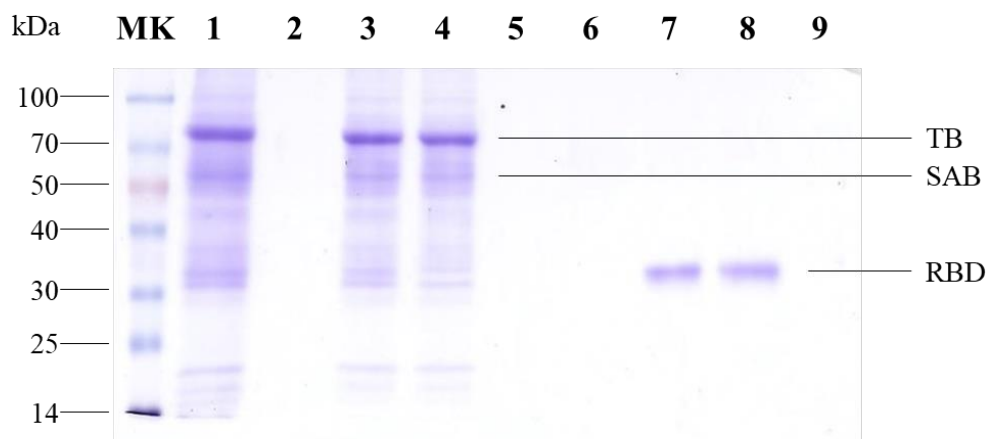
Se realizó un IMAC con el fin de purificar la RBD a partir de sobrenadantes de expresión en células Sf9 a los 6 dpi. Para poder facilitar esta operación, como ya se mencionó, se expresó RBD como proteína de fusión con una etiqueta de histidinas en el

extremo amino. El material de partida presentaba una concentración total de proteínas de 1,72 g/l.

Inmediatamente después de la obtención de las muestras, se las clarificó mediante centrifugación a fin de eliminar células enteras y debris celular que complican los procesos de purificación de la proteína de interés. Además, dado que los medios de cultivos de células de insecto tienen un pH 6–6,5 -no apropiado para realizar IMAC- y que contienen algunos aminoácidos que interfieren en la interacción del producto recombinante con el ligando (Ni) se procedió a acondicionar el material de partida, tal como se indica en la sección 3.5. Luego de la clarificación y acondicionamiento de la muestra se llevó a cabo la purificación de RBD recombinante por IMAC.

Se realizó un seguimiento de la purificación por IMAC por SDS-PAGE y Western Blot. Se pudo observar (Figura 23A) que la gran proporción de proteínas contaminantes no interaccionaron con la matriz y que eluyeron en el *pass through* y en los primeros lavados con buffer de equilibración. Entre los principales contaminantes presentes en sobrenadantes de cultivos se encuentra la seroalbúmina bovina (SAB) y la transferrina bovina (TB) provenientes del SFB. La proteína RBD fue capaz de interaccionar específicamente con la matriz demostrando la correcta exposición de la etiqueta de histidinas. Se observó una pequeña pérdida de RBD en el lavado con 80 mM de imidazol (Figura 23B). Sin embargo, más del 95% de RBD fue posible recuperar con el agregado imidazol 500 mM.

A)



B)

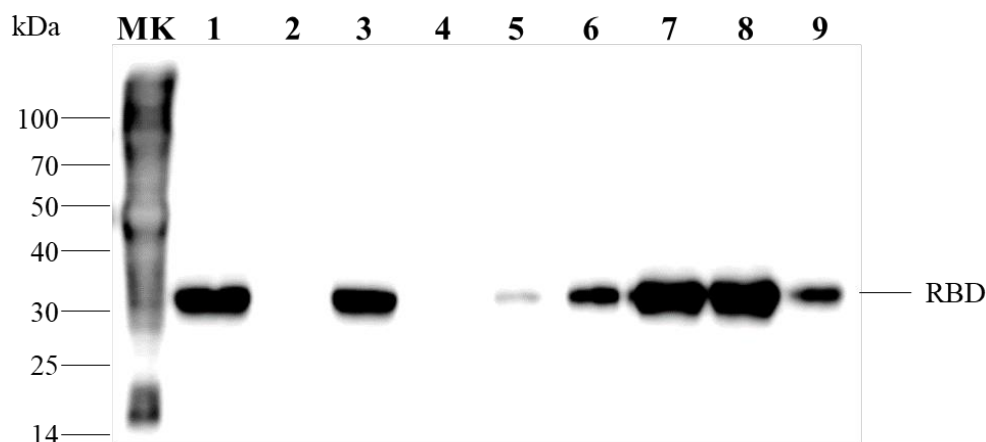
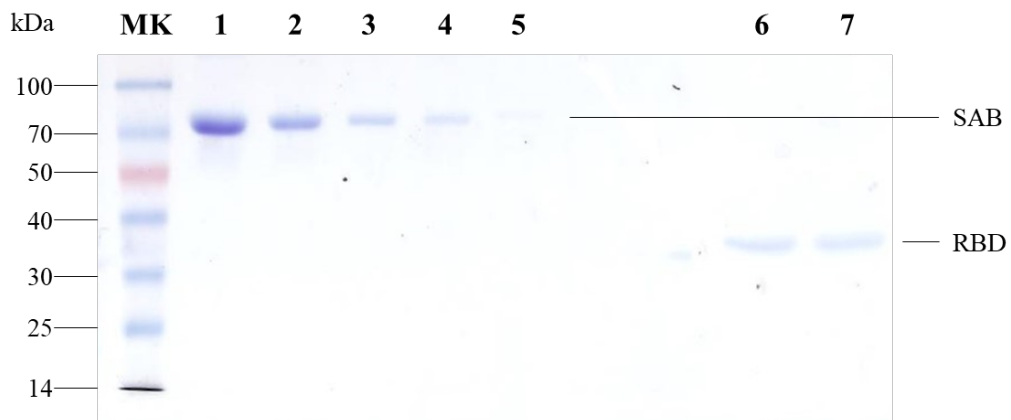


Figura 23. Seguimiento de la purificación de RBD por IMAC de sobrenadantes de expresión por SDS-PAGE revelado con tinción de Coomassie Blue (A) y Western Blot (B). Calles: 1, sobrenadante de expresión 6 dpi; 2, permeado; 3, sobrenadante acondicionado por diafiltración (retentato-*input*); 4 *pass through*; 5, lavado con imidazol 80 mM; 6-9, fracciones 1-4 eluidas de la matriz respectivamente.

El esquema de purificación llevado a cabo derivó en la obtención de RBD recombinante con un rendimiento de 7,5 mg/l o 7,5 $\mu\text{g}/1.10^6$ células (Figura 24) y una pureza mayor al 98%. El alto grado de pureza obtenido fue confirmado por RP-HPLC (Figura 25).

A)



B)

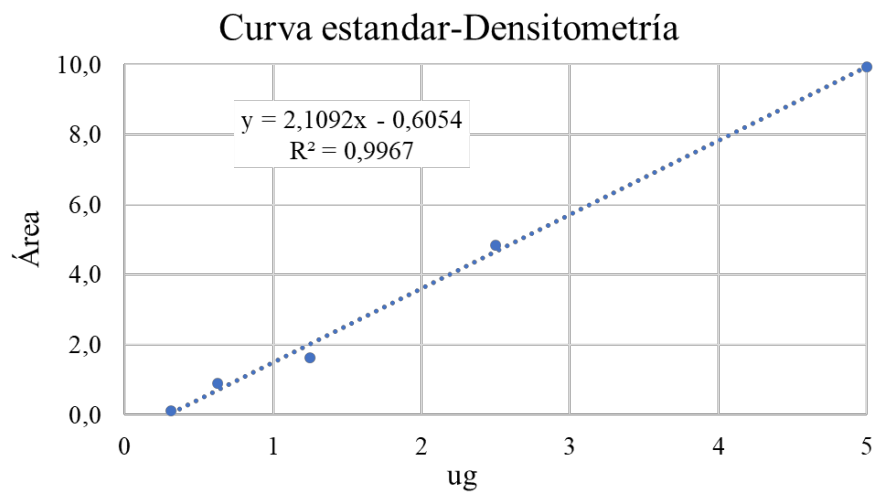


Figura 24. Análisis y cuantificación de la RBD purificada a partir de SDS-PAGE y densitometría utilizando el programa ImageJ. (A) SDS-PAGE. (B) Curva de calibración con una solución patrón de SAB. Calles: 1-5, diluciones seriadas al medio de solución patrón de SAB (5 μ g, 2,5 μ g, 1,25 μ g, 0,625 μ g, 0,3125 μ g); 6-7, fracciones 2-3 eluidas de la matriz, respectivamente.

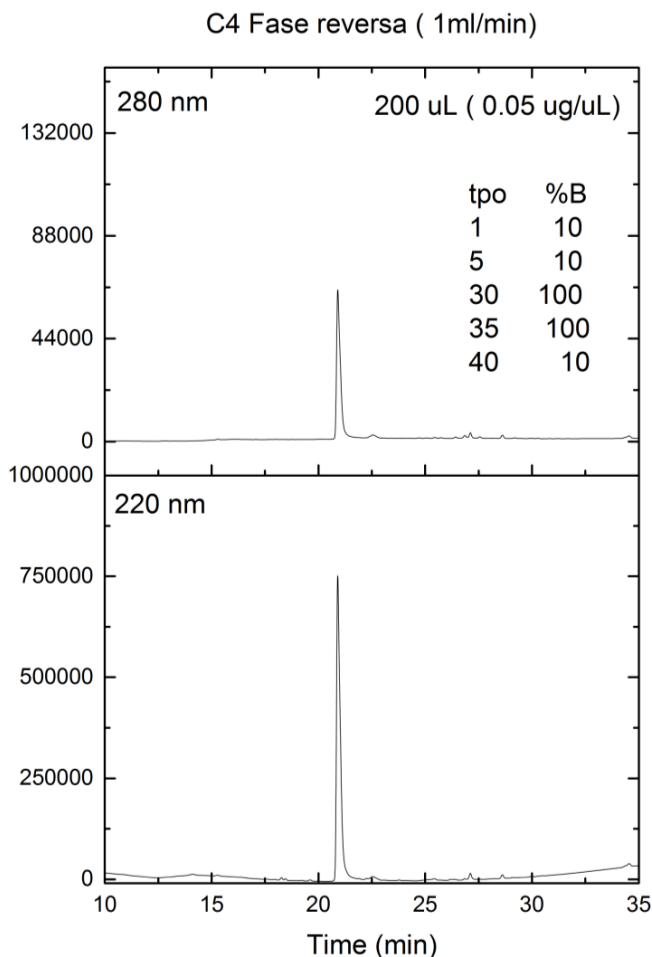


Figura 25. Análisis por RP-HPLC de la RBD recombinante purificada.

Además, con el fin de analizar la posible presencia de ADN contaminando el producto purificado, se amplificó este material por PCR a partir de las muestras cromatográficas. Se pudo evidenciar la presencia de ADN viral en el producto final purificado. El producto de amplificación esperado constaba de 1076 pb. En la Figura 26 se muestra el gel correspondiente. La presencia de ADN viral no representa un obstáculo para el uso de la proteína recombinante con fines diagnósticos. Sin embargo, en el caso que se quisiera utilizar este insumo como un antígeno vacunal se debería realizar un pretratamiento de la muestra con DNasas a fin de eliminar el material genético viral previo a la cromatografía.

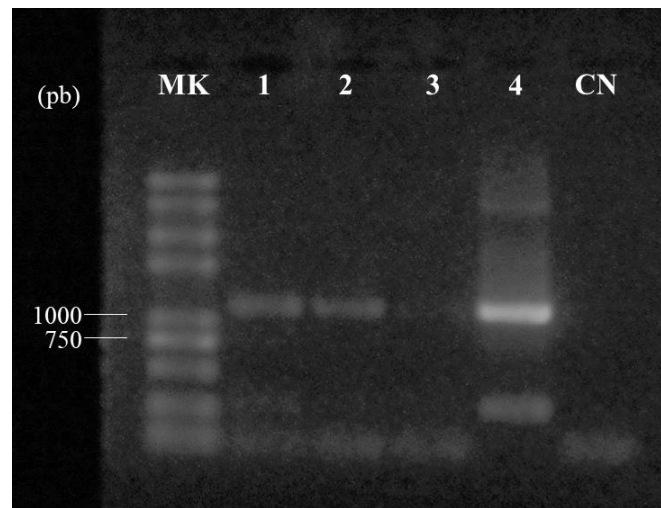


Figura 26. Verificación por PCR de la presencia de ADN viral en las fracciones cromatográficas. MK: marcador de peso molecular. CN: control negativo. Calles: 1, *input*; 2-3, fracciones eluidas de la matriz con 500 mM de imidazol; 4, PCR de pFBD-polhpSeL-gpRBDhis (control positivo).

La estrategia de producción utilizada en este Trabajo de Tesis logró incrementar notablemente el rendimiento de RBD recombinante alcanzado hasta el momento en el sistema baculovirus-células de insectos. Previamente, Amanat *et al.*, (2021) habían expresado RBD bajo el promotor tradicional polh en células de insectos alcanzando rendimientos cercanos a 1,5 mg/l. En este trabajo de Tesis, la expresión de RBD bajo el promotor quimera polhpSeL resultó una clara ventaja estratégica para alcanzar un rendimiento de 7,5 mg/l en BEVS comparable al obtenido en células de mamíferos (10 mg/l) (Villafañe *et al.*, 2021). Además, la secuencia genética de RBD fue optimizada considerando la frecuencia de uso de codones para insectos, lo que posiblemente haya incidido también positivamente en este resultado.

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que el promotor polhpSeL desarrollado por Martínez Solís *et al.* (2016) permite incrementar en un 40% los niveles de producción de proteínas heterólogas de origen viral en el sistema BEVS respecto al promotor tradicional polh (Targovnik *et al.*, 2019). Entre las plataformas biotecnológicas actualmente disponibles, las células de insecto resultan muy atractivas para la producción de la RBD a gran escala. Por ejemplo, las células de insecto son más fáciles de cultivar y más tolerantes a la osmolaridad y la concentración de metabolitos secundarios que las células de mamíferos (Ikonomou *et al.*, 2003). Incluso, el sistema BEVS resulta más eficiente que

las levaduras para la producción de glicoproteínas. Si bien, en levaduras (*P. pastoris*) está descripta la expresión de RBD recombinante con altos rendimientos (45 mg/l) en el sobrenadante de cultivo, ésta se presenta como isoformas a causa de la glicosilación heterogénea. Según los autores, la RBD mayoritaria expresada en el sistema de levaduras se encuentra hiperglicosilada (45-50 kDa), lo que podría afectar el esquema productivo y la función biológica de la proteína (Argentinian AntiCovid Consortium, 2020).

4.5. Determinación de la condición óptima para la expresión de RBDhis en sobrenadantes de cultivo de células Sf9

Los niveles de expresión proteica en general varían según el porcentaje de SFB en el medio de cultivo dado que éste es un importante nutriente que aumenta la viabilidad celular. Debido a esto, es interesante estudiar la expresión de proteínas recombinantes en medios libres de SFB y con alto contenido de SFB.

Para la realización de la cinética de expresión de gpRBDhis en estas condiciones se infectaron cultivos de células Sf9 en suspensión y a cada uno de ellos se le agregó una concentración diferente de SFB: 0% (sin suplementar), 1% y 10%. Nuevamente, se tomaron muestras de los sobrenadantes de expresión diariamente y hasta el dpi 6, las que fueron analizadas por Western Blot.

La Figura 27 muestra los dpi 4, 5 y 6 de las distintas condiciones de expresión: 0%, 1% y 10%. En comparación con la condición de 1% de SFB, el nivel de expresión de RBD en células Sf9 en medio sin suplementar fue aparentemente igual. No obstante, cuando se ensayó la expresión de RBD en medio de cultivo suplementado con 10% de SFB se observó un aumento significativo en los niveles de expresión (Figura 27B). A partir de la densitometría (Figura 27C) se pudo establecer que los niveles de expresión de RBD recombinante en la condición de 10% de SFB aproximadamente triplica el obtenido con 1% SFB. Este dato es muy relevante y se tendrá en consideración en el futuro cuando se evalúen diferentes concentraciones de SFB a fin de determinar la concentración óptima para maximizar el rendimiento de RBD, considerando tanto los costos asociados a la suplementación como a la purificación a mayor escala de trabajo. El seguimiento de la expresión de RBD en suspensión a distintos dpi y concentraciones de SFB se realizó también por SDS-PAGE. La Figura 27A muestra las proteínas totales presentes en el

sobrenadante de expresión de las células infectadas son constantes dentro de cada condición ensayada. Como referencia se observan constantes las bandas correspondientes a SAB y TB presentes en el SFB.

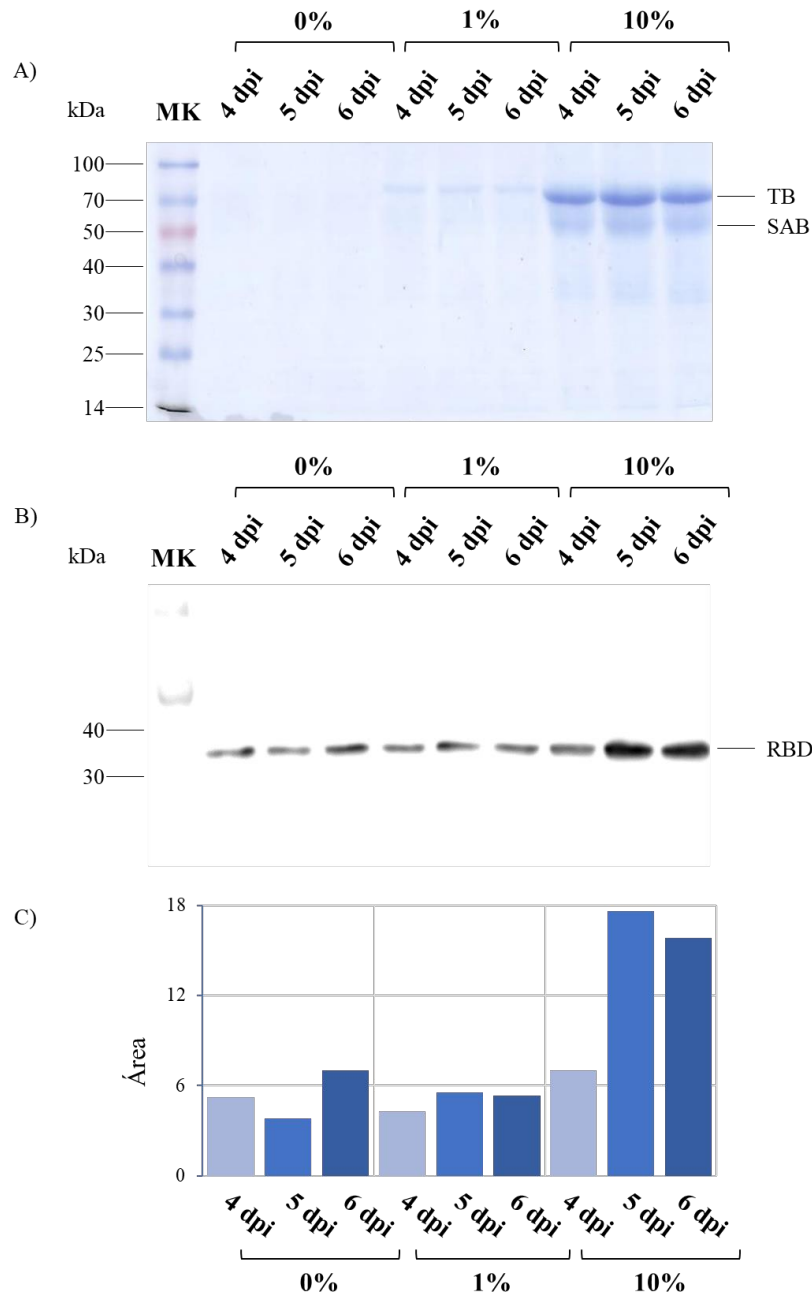


Figura 27. Comparación de los niveles de expresión de RBD en células Sf9 crecidas en medio de cultivo suplementado con distintas concentraciones de SFB a los dpi 4, 5 y 6. Western Blot (A) y densitometría utilizando el programa ImageJ (B). MK: marcador de peso molecular. 0%, 1%, 10% corresponde con las concentraciones de SFB.

4.6. Detección de anticuerpos en sueros de pacientes vacunados o infectados con SARS-CoV-2 con RBDhis recombinante

La inmunorreactividad de la RBDhis recombinante purificada se analizó en el laboratorio LIE-IDEHU Facultad de Farmacia y Bioquímica (UBA) bajo la dirección de la Dra. Silvina Valdez. Para ello se trabajó con un diseño de ELISA colorimétrico basado la detección de anticuerpos anti-SARS-CoV-2, que permite detectar todos los isotipos y de cualquier especie animal. Para este diseño se utilizó la proteína RBD recombinante pura como *coating* (0,1 µg/pocillo) de la placa de ELISA y se reveló la presencia de anticuerpos específicos con Spike-biotina y luego estreptavidina-peroxidasa. En el ensayo se incluyó un suero equino preinmune y un suero equino post inmunización con Spike (Figura 28). En paralelo se muestran los resultados con *coating* con Spike recombinante como control. Los resultados obtenidos se expresaron como DO específica = DO muestra menos DO blanco. El blanco corresponde a la señal obtenida cuando la muestra es reemplazada por el buffer PBS.

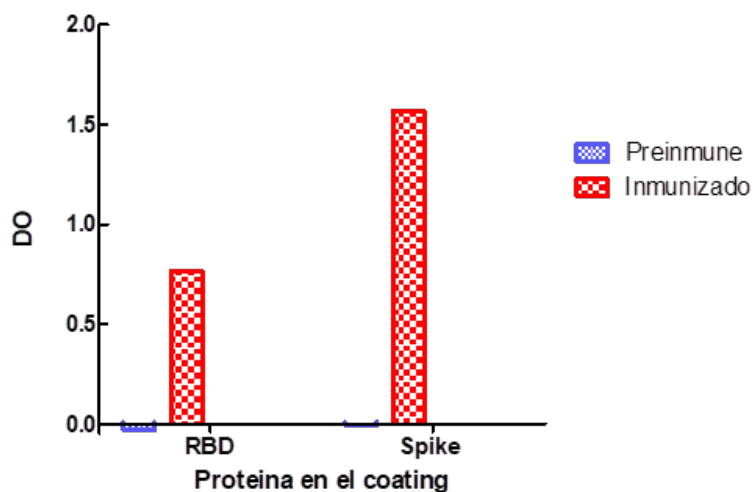


Figura 28. Evaluación de la inmunorreactividad de RBD para la detección de anticuerpos en sueros hiperinmunes equinos.

La Figura 29 muestra la distribución de señales, expresadas como SDs, obtenidas con el mismo diseño de ELISA donde se analizó un panel de 15 sueros humanos negativos obtenidos prepandemia y 15 sueros de pacientes COVID-19 positivos confirmados por

institutos públicos de investigación científica a concentrar sus esfuerzos en la búsqueda y desarrollo de vacunas, terapias, y sobre todo pruebas diagnósticas eficaces para detectar, rastrear y comprender mejor las respuestas humorales humanas a la infección por SARS-CoV-2. Las pruebas serológicas son fundamentales para estudiar la cinética de los anticuerpos y la eficacia de la neutralización y monitorizar las reinfecciones con variantes genéticas y nuevas cepas de virus, en particular, la duración de los anticuerpos en individuos expuestos al virus y la inmunidad mediada por vacunas.

Actualmente, las proteínas Spike y RBD son los antígenos más fiables para medir la abundancia de anticuerpos neutralizantes. La complejidad estructural de la proteína Spike de longitud completa exige grandes volúmenes de cultivos celulares para su producción y los rendimientos obtenidos no resultan satisfactorios. Por otro lado, el dominio RBD de Spike mostró buenos niveles de expresión en células de mamíferos (Stadlbauer *et al*, 2020). El principal interés comercial de la RBD radica en que constituye un insumo en la fabricación de kits de diagnóstico médico además de ser utilizado como inmunógeno tanto para el desarrollo de sueros hiperinmunes como de vacunas.

En el presente trabajo, se desarrolló un esquema de producción y purificación de RBD recombinante en células de insecto que logró alcanzar un rendimiento de 7,5 mg/l, comparable al obtenidos en células de mamíferos, con una pureza mayor al 98%. Teniendo en cuenta el nivel de expresión y el rendimiento logrado en la purificación por IMAC, se estimó que con 1 L de cultivo se puede producir RBD para utilizar como antígeno para 75000 determinaciones de ELISA, ya que se pudo determinar que con 0,1 µg de antígeno recombinante por pocillo es suficiente. Partiendo ya de un stock viral de un título de $2,4 \times 10^8$ UFP/ml, el tiempo necesario para obtener 7,5 mg de RBDhis, teniendo en cuenta la expansión del cultivo, expresión y cosecha del RBDhis, sería de 12 días aproximadamente.

Anteriormente se describió que la producción en células de insecto conlleva menores costos de mantenimiento y requerimiento de laboratorio para la producción de RBD en comparación con las células de mamífero. Los altos precios del mercado de RBD se debe principalmente a que su producción se lleva a cabo en células de mamífero, principalmente células embrionarias humanas de riñón (HEK293). La Tabla 3 muestra el precio de las principales empresas que comercializan RBD.

Tabla 3. Precios de las principales empresas que comercializan RBD.

Empresa	Precio	Cantidad
ACRO Biosystems	\$ 400,00 USD	100 ug
ProteoGenix	\$ 195,00 EURO	100 ug
Abbeva	\$ 638,00 USD	50 ug
Sigma-Aldrich	\$ 589,27 USD	50ug

Se calculó que el costo de producción de RBD en cultivos celulares de insectos es de \$3,6 USD los 50 µg. La Tabla 4 resume los insumos tenidos en cuenta para determinar el costo de producción y purificación de 7,5 mg de RBD. Tomando un promedio de los precios de la Tabla X de \$634,69 los 50 µg de RBD, el costo de producción en células de insecto resultó aproximadamente 180 veces menor que el precio de venta promedio. Es por ello que el proceso de expresión y purificación de RBD recombinante en cultivos en suspensión de células de insecto resultó ser un excelente método para producir altos niveles de RBD para aplicaciones biotecnológicas.

Tabla 4. Costos de producción requeridos para producir de 7,5 mg de RBD.

Insumos	Precio (USD)
Medio de cultivo	\$ 400,00
Suero fetal bovino	\$ 4,29
Material descartable	\$ 32,84
Antibiótico	\$ 3,00
Purificación	\$ 100,00
Total	\$ 540,13

5. CONCLUSIONES

En el presente trabajo de Tesis se logró incrementar sustancialmente el rendimiento de producción de RBD del SARS-CoV-2 en el sistema BEVS incluyendo en el diseño de la construcción genética un promotor quimera y optimizando además la composición del medio de cultivo. La proteína RBD se obtuvo con alto grado de pureza en un solo paso cromatográfico lo que reduce significativamente el costo del proceso. La calidad de la proteína es apta para diferentes aplicaciones y el proceso biotecnológico aquí descrito constituye un claro aporte para sumar herramientas en la lucha contra la COVID-19.

ANEXO A. SECUENCIA DE OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN PROCESOS DE AMPLIFICACIÓN POR PCR

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en procesos de amplificación por PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
Pfw RBD-BamHI	cgCGGATCCAGGGTGCAGCCTACCGAATC
Prev RBD-EcoRI	CAAGAACAAGTGCGTGAACTTCATCATCACCACCACCAC-TAAgaattccgg
Pfw GP67-universal	TCCGGATTATTCATACCGTCCCACCAT
Prev GP67-universal	CCGTAATGTTAAACCCGACACGATGAAG
Pfw GP64-EcoRI	ccggaattcATGCTACTAGTAAATCAGTCAC
Pfw pFBD-universal	ATATTCCGGATTATTCATACCG
Prev pFBD-universal	CAGCCATACCACATTTGTAG
Pfw M13	CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG
Prev M13	AGCGGATAACAATTCACACAGG

En verde se muestra el codón de terminación y en azul la secuencia que codifica para el tag de histidinas. Los oligonucleótidos de orientación sentido se indican como Pfw y los de orientación antisentido se indican como Prev.

ANEXO A. SECUENCIA DE gpRBDhis

Pfw GP64-EcoRI →

CGCGGATCTATGCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAG

CAAGATGGTAAGCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCT

Pfw RBD-BamHI →

TTGCGGCGGATCTTGGATCCAGGGTGCAGCCTACCGAATCCATCGTCAGATTCCCCAAC

ATCACTAACCTGTGCCATTTCGGCGAGGTCTTCAACGCCACCAGATTCGCTAGCGTGTA

CGCCTGGAACCGCAAGCGTATCTCAAACCTGCGTCGCCGACTACTCCGTGCTGTACAACCT

CAGCTTCCTTCAGCACCTTCAAGTGCTACGGTGTGTACCTACTAAGCTGAACGACCTG

TGCTTCACCAACGTCTACGCTGACTCCTTCGTGATCCGCGGCGACGAGGTCCGTCAGAT

CGCTCCTGGACAGACTGGAAAGATCGCTGACTACAACCTACAAGCTGCCAGACGACTTCA

CCGGTTGCGTCATCGCCTGGAACCTCAAACAACCTGGACTCCAAAGTGGGTGGCAACTAC

AACTACCTGTACAGGCTGTTTCAGAAAGTCAAACCTGAAGCCTTTCGAGAGGGACATCAG

CACTGAAATCTACCAGGCTGGCTCTACCCCTGCAACGGTGTGAGGGCTTCAACTGCT

ACTTCCCACTGCAGTCCTACGGATTCCAGCCTACTAACGGTGTGGGCTACCAGCCCTAC

AGAGTGGTCGTGCTGAGCTTCGAACTGCTGCACGCCCCAGCTACTGTGTGCGGTCCTAA

← Pfw RBD-EcoRI

GAAGTCTACCAACCTGGTCAAGAACAAGTGCCTGAACTTCCATCATCACCACCACCACT

AAGAATTCCGG

Referencias: *Tag de histidinas*, *Sitios de restricción BamHI/EcoRI*, *Codón de terminación*, *Señal de secreción GP64*, RBD

ANEXO B. SECUENCIA DE pAcGP67-B (3901-4535)

CTGCGAGCAGTTGTTTGTGTTGTTAAAAATAACAGCCATTGTAATGAGACGCACAAACTAA

TATCACAAACTGGAAATGTCTATCAATATATAGTTGCTGATATCATGGAGATAATTAA

ATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTGTAATA

Pfw GP67-universal

AAAAAACCTATAAAATATTCCGGATTATTCATACCGTCCCACCATCGGGCGCGGATCTAT

GCTACTAGTAAATCAGTCACACCAAGGCTTCAATAAGGAACACACAAGCAAGATGGTAA

GCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGGCGGCGGCATTCTGCCTTTGCGGCGGAT

CTTGGATCCCGGGCCATGGGAATTCCGGAGCGGCCGCTGCAGATCTGATCCTTTCCTGG

Prev GP67-universal

GACCCGGCAAGAACC AAAACTCACTCTCTTCAAGGAAATCCGTAATGTTAAACCCGAC

ACGATGAAGCTTGTTCGTTGGATGGAAAGGAAAAGAGTTCTACAGGGAAACTTGGACCCG

CTTCATGGAAGACAGCTTCCCCATTGTTAACGACCAAGAAGTGATGGATGTTTTCTTG

TTGTCAACATGCGTCCCCTAGACCCAACCGTTGTTACAAATTCC

Referencias: [promotor de poliedrina](#), [MCS](#), [Señal de secreción GP64](#), [RBD](#)

ANEXO C. SECUENCIA DE pFBD-polhpSeL-X (4312-5728)

CGAGTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAGAGTGATCCCGGCGGCGGTCACGAACTCCAGCA
GGACCATGTGATCGCGCTTCTCGTTGGGGTCTTTGCTCAGGGCGGACTGGGTGCTCAGG
TAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACGGGGCCGTCGCCGATGGGGGTGTTCTGCTGGTAGTG
GTCGGCGAGCTGCACGCTGCCGTCCTCGATGTTGTGGCGGATCTTGAAGTTCACCTTGA
TGCCGTTCTTCTGCTTGTCGGCCATGATATAGACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTACTCC
AGCTTGTGCCCCAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTCGATGCCCTTCAGCTCGATGCG
GTTACACCAGGGTGTGCGCCCTCGAACTTCACCTCGGCGCGGGTCTTGTAGTTGCCGTCGT
CCTTGAAGAAGATGGTGCCTCCTGGACGTAGCCTTCGGGCATGGCGGACTTGAAGAAG
TCGTGCTGCTTCATGTGGTTCGGGGTAGCGGCTGAAGCACTGCACGCCGTAGGTCAGGGT
GGTCACGAGGGTGGGCCAGGGCACGGGCAGCTTGCCGGTGGTGCAGATGAACTTCAGGG
TCAGCTTGCCGTAGGTGGCATCGCCCTCGCCCTCGCCGGACACGCTGAACTTGTGGCCG
TTTACGTCGCCGTCCAGCTCGACCAGGATGGGCACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCC
CTTGCTCACCATCTCGAGTCGAGATCCCGGGTGATCAAGTCTTCGTCGAGTGATTGTAA
ATAAAATGTAATTTACAGTATAGTATTTTAATTAATATACAAATGATTTGATAATAATT
CTTATTTAACTATAATATATTGTGTTGGGGTGAATTAAAGGTCGGTATACTCCGGAATA

TTAATAGATCATGGAGATAATTAAAATGATAACCATCTCGCAAATAAATAAGTATTTTA

Pfw pFBD-universal

CTGTTTTCGTAACAGTTTTGTAAATAAAAAACCTATAAATATTCCGGATTATTCATACC

▶

GTCCCACCATCGGGCGCGGATCCAAGGCCACTAGTGCGGCCGCTCTGCAGTCTCGAGGT

TCAATAATCAATAAACCTCTCTATTATCCTTTGTAAATTTTTTATTTACTTTGTTGTCC

ATTGCTGATCATTTATTAAGTCTTTTGGCAAAAATTAAATTTTTGCTACAATATACTAG

TCGCGGCCGCTTTCGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGACAAGCTTGAATTCAAAGGCCTA

CGTCGACGAGCTCACTAGTTCGCGGCCGCTTTCGAATCTAGAGCCTGCAGTCTCGACAAG

Prev pFBD-universal

←

CTTGTCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTGTAGAGGTTTTACT

TGCTTTAAAAACCTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAAATGAATGCAATTG

Referencias: [EGFP](#), [promotor p10](#), [promotor quimera polhpSeL](#), [Sitio de restricción EcoRI](#)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Airenne, K. J., Makkonen, K. E., Mähönen, A. J., & Ylä-Herttuala, S. (2011). Baculoviruses mediate efficient gene expression in a wide range of vertebrate cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 737, 279–301. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-095-9_12
- Akermann H-W, Smirnoff WA. A morphological investigation of 23 baculoviruses. *J Invertebr Pathol.* 1983;41:269–280. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(83\)90244-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(83)90244-6)
- Altmann F. (2007). The role of protein glycosylation in allergy. *International archives of allergy and immunology*, 142(2), 99–115. <https://doi.org/10.1159/000096114>
- Altmann, F., Schwihla, H., Staudacher, E., Glössl, J., & März, L. (1995). Insect cells contain an unusual, membrane-bound beta-N-acetylglucosaminidase probably involved in the processing of protein N-glycans. *The Journal of biological chemistry*, 270(29), 17344–17349. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.29.17344>
- Amanat, F., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Nguyen, T. H. O., Chromikova, V., McMahon, M., ... Krammer, F. (2020). A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0913-5>
- Argentinian AntiCovid Consortium (2020). Structural and functional comparison of SARS-CoV-2-spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells. *Scientific reports*, 10(1), 21779. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78711-6>
- Au, S., Wu, W., & Panté, N. (2013). Baculovirus Nuclear Import: Open, Nuclear Pore Complex (NPC) Sesame. *Viruses*, 5(7), 1885–1900. <https://doi.org/10.3390/v5071885>
- Aumiller, J. J., Hollister, J. R., & Jarvis, D. L. (2003). A transgenic insect cell line engineered to produce CMP-sialic acid and sialylated glycoproteins. *Glycobiology*, 13(6), 497–507. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg051>

- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., & Possee, R. D. (1994). The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*, 202(2), 586–605. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1380>
- Beljelarskaya SN. (2002). A Baculovirus Expression System for Insect Cells. *Mol Biol*; 36:281-292.
- Bertram, S., Dijkman, R., Habjan, M., Heurich, A., Gierer, S., Glowacka, I., Welsch, K., Winkler, M., Schneider, H., Hofmann-Winkler, H., Thiel, V., & Pöhlmann, S. (2013). TMPRSS2 activates the human coronavirus 229E for cathepsin-independent host cell entry and is expressed in viral target cells in the respiratory epithelium. *Journal of virology*, 87(11), 6150–6160. <https://doi.org/10.1128/JVI.03372-12>
- Bilimoria, S. L. & Kurstak, E. (1991). *Viruses of Invertebrates*. New York, USA, CRC Press 41, 1–13
- Bilimoria, S. L. The biology of nuclear polyhedrosis viruses in *Virus of Invertebrates* 1–72 (Routledge, 2017).
- Blissard G. W. (1996). Baculovirus--insect cell interactions. *Cytotechnology*, 20(1-3), 73–93. <https://doi.org/10.1007/BF00350390>
- Bonning, B. C. (2005). *Baculoviruses: Biology, Biochemistry, and Molecular Biology*. *Comprehensive Molecular Insect Science*, 233–270. doi:10.1016/b0-44-451924-6/00084-3
- Burgess, S.K. (1977). Molecular Weights of Lepidopteran Baculovirus DNAs: Derivation by Electron Microscopy. *Journal of General Virology*, 37, 501-510.
- Casalino, L., Gaieb, Z., Goldsmith, J. A., Hjorth, C. K., Dommer, A. C., Harbison, A. M., Fogarty, C. A., Barros, E. P., Taylor, B. C., McLellan, J. S., Fadda, E., & Amaro, R. E. (2020). Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS central science*, 6(10), 1722–1734. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01056>
- Chaabihi, H., Ogliastro, M. H., Martin, M., Giraud, C., Devauchelle, G., & Cerutti, M. (1993). Competition between baculovirus polyhedrin and p10 gene expression during infection of insect cells. *Journal of virology*, 67(5), 2664–2671. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.5.2664-2671.1993>

- Charlton, C. A., & Volkman, L. E. (1991). Sequential rearrangement and nuclear polymerization of actin in baculovirus-infected *Spodoptera frugiperda* cells. *Journal of virology*, 65(3), 1219–1227. <https://doi.org/10.1128/JVI.65.3.1219-1227.1991>
- Chisholm, G. E., & Henner, D. J. (1988). Multiple early transcripts and splicing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus IE-1 gene. *Journal of virology*, 62(9), 3193–3200. <https://doi.org/10.1128/JVI.62.9.3193-3200.1988>
- Ciccarone, V. C., Polayes, D. A., & Luckow, V. A. (1998). Generation of Recombinant Baculovirus DNA in *E. coli* Using a Baculovirus Shuttle Vector. *Methods in molecular medicine*, 13, 213–235. <https://doi.org/10.1385/0-89603-485-2:213>
- Couch J. A. (1974). An enzootic nuclear polyhedrosis virus of pink shrimp: ultrastructure, prevalence, and enhancement. *Journal of invertebrate pathology*, 24(3), 311–331. [https://doi.org/10.1016/0022-2011\(74\)90139-6](https://doi.org/10.1016/0022-2011(74)90139-6)
- Cox M. M. (2012). Recombinant protein vaccines produced in insect cells. *Vaccine*, 30(10), 1759–1766. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.01.016>
- Cox, M. M. J. & Hashimoto, Y. (2011). A fast track influenza virus vaccine produced in insect cells. *Journal of Invertebrate Pathology*. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2011.05.003>
- Cox, M. M. J. (2004). Commercial production in insect cells. *Bioprocess Int.* 8
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2009). Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnology advances*, 27(3), 297–306. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.008>
- Fabre M, Arrias P, Masson T, Pidre M, Romanowski V (2020) Baculovirus-derived vectors for immunization and therapeutic applications. In: Ennaji M (ed) Emerging and Reemerging Viral Pathogens. Academic Press, United States, pp 197-224. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814966-9.00011-1>
- Federici B.A. (1997) Baculovirus Pathogenesis. In: Miller L.K. (eds) The Baculoviruses. The Viruses. Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1834-5_3

- Federici BA. (1986). Ultrastructure of baculoviruses, p 61-88. In Granados RR, Federici BA (ed), The biology of baculoviruses, vol I. CRC Press, Boca Raton.
- Francki RI, Fauquet CM, Kundson DL, Brown F. editors. Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Arch Virol 1991; 2:117.
- Fraser MJ. Ultrastructural observation of virion maturation in *Autographa californica* nuclear virus infected *Spodoptera frugiperda* cell culture. J Ultrastruct Mol Struct 1986; 95: 189-195. [https://doi.org/10.1016/0889-1605\(86\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0889-1605(86)90040-6)
- Grace T. D. (1962). Establishment of four strains of cells from insect tissues grown in vitro. *Nature*, 195, 788–789. <https://doi.org/10.1038/195788a0>
- Granados R, Williams K. In vivo infection and replication of baculoviruses. En: R. Granados, B. Federici editors. The biology of baculoviruses. Florida: CRC Press, Boca Raton, 1986. p. 89-108.
- Grant, O. C., Montgomery, D., Ito, K., & Woods, R. J. (2020). Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield: implications for immune recognition. *bioRxiv: the preprint server for biology*, 2020.04.07.030445. <https://doi.org/10.1101/2020.04.07.030445>
- Grzywacz, D. (2017). Basic and Applied Research: Baculovirus. *Microbial Control of Insect and Mite Pests*, 27–46. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803527-6.00003-2>
- Haase, S., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Baculovirus insecticides in Latin America: historical overview, current status and future perspectives. *Viruses*, 7(5), 2230–2267. <https://doi.org/10.3390/v7052230>
- Haines F J, Possee R D, King L A. (2008). Baculoviruses: Expression Vector. *Elsevier*
- Hall DW, Hazard EI. A nuclear polyhedrosis virus of a caddisfly, *Neophylax* sp. J Invertebr Pathol. 1973;21:323–4.
- Harrison, R. L., Herniou, E. A., Jehle, J. A., Theilmann, D. A., Burand, J. P., Becnel, J. J., Krell, P. J., van Oers, M. M., Mowery, J. D., Bauchan, G. R., & Ictv Report

- Consortium (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Baculoviridae. *The Journal of general virology*, 99(9), 1185–1186. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001107>
- Hegedus, D., Erlandson, M., Gillott, C., & Toprak, U. (2009). New insights into peritrophic matrix synthesis, architecture, and function. *Annual review of entomology*, 54, 285–302. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.54.110807.090559>
- Herniou, E. A. *et al.* (2011). Baculoviridae. Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses 163–174.
- Herniou, Elisabeth & Arif, Basil & Becnel, J.J. & Blissard, Gary & Bonning, Bryony & Harrison, R. & Jehl, J.A. & Theilmann, David & Vlak, Just. (2011). OE Family Baculoviridae.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N. H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, 181(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hsieh, C. L., Goldsmith, J. A., Schaub, J. M., DiVenere, A. M., Kuo, H. C., Javanmardi, K., Le, K. C., Wrapp, D., Lee, A. G., Liu, Y., Chou, C. W., Byrne, P. O., Hjorth, C. K., Johnson, N. V., Ludes-Meyers, J., Nguyen, A. W., Park, J., Wang, N., Amengor, D., Lavinder, J. J., ... McLellan, J. S. (2020). Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6510), 1501–1505. <https://doi.org/10.1126/science.abd0826>
- Huang, Y., Yang, C., Xu, X. F., Xu, W., & Liu, S. W. (2020). Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta pharmacologica Sinica*, 41(9), 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>
- Huber J. 1986. Use of baculoviruses in pest management programs, p 181-202. *In* Granados RR, Federici BA (ed), The biology of baculoviruses, vol II. CRC, Boca Raton.
- Ikonomou, Laertis & Schneider, Yves-Jacques & Agathos, Spiros. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Applied microbiology and biotechnology*. 62. 1-20. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1223-9>

- Jarvis, D. L., Kowar, Z. S., & Hollister, J. R. (1998). Engineering N-glycosylation pathways in the baculovirus-insect cell system. *Current opinion in biotechnology*, 9(5), 528–533. [https://doi.org/10.1016/s0958-1669\(98\)80041-4](https://doi.org/10.1016/s0958-1669(98)80041-4)
- Jehle, J. A., Blissard, G. W., Bonning, B. C., Cory, J. S., Herniou, E. A., Rohrmann, G. F., Theilmann, D. A., Thiem, S. M., & Vlak, J. M. (2006). On the classification and nomenclature of baculoviruses: a proposal for revision. *Archives of virology*, 151(7), 1257–1266. <https://doi.org/10.1007/s00705-006-0763-6>
- Jhaveri R. (2021). The Next Set of COVID-19 Vaccines: Leveraging New Development Platforms to Increase Access for More People Around the World. *Clinical therapeutics*, 43(4), 702–710. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2021.03.007>
- King LA, Posee PD. (1992). The baculovirus expression system: a laboratory guide. London: Chapman and Hall
- Kitts, P. A., & Possee, R. D. (1993). A method for producing recombinant baculovirus expression vectors at high frequency. *BioTechniques*, 14(5), 810–817.
- Kost TA, Condreay JP (2002) Innovations—Biotechnology: Baculovirus vectors as gene transfer vectors for mammalian cells: Biosafety considerations. *Appl Biosaf* 7:167–169. <https://doi.org/10.1177/153567600200700312>
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature biotechnology*, 23(5), 567–575. <https://doi.org/10.1038/nbt1095>
- Krieg A., Franz J.M., Groner A., Huber J., Miltenburger H.G. Safety of entomopathogenic viruses for control of insect pests. *Environ. Conserve.* 1980;7:158–160. <https://doi.org/10.1017/S0376892900007232>
- Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., & Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of invertebrate pathology*, 132, 1–41. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2015.07.009>
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., Fan, S., Zhang, Q., Shi, X., Wang, Q., Zhang, L., & Wang, X. (2020). Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding

- domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
- Li F. (2016). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology*, 3(1), 237–261. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-110615-042301>
- Li, F., Li, W., Farzan, M., & Harrison, S. C. (2005). Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5742), 1864–1868. <https://doi.org/10.1126/science.1116480>
- Li, W., Moore, M. J., Vasilieva, N., Sui, J., Wong, S. K., Berne, M. A., Somasundaran, M., Sullivan, J. L., Luzuriaga, K., Greenough, T. C., Choe, H., & Farzan, M. (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*, 426(6965), 450–454. <https://doi.org/10.1038/nature02145>
- Long, G., Pan, X., Kormelink, R., & Vlak, J. M. (2006). Functional entry of baculovirus into insect and mammalian cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of virology*, 80(17), 8830–8833. <https://doi.org/10.1128/JVI.00880-06>
- López-Vidal, J., Gómez-Sebastián, S., Sánchez-Ramos, I., & Escribano, J. M. (2013). Characterization of a Trichoplusia ni hexamerin-derived promoter in the AcMNPV baculovirus vector. *Journal of biotechnology*, 165(3-4), 201–208. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.03.012>
- Lu, Roujian & Zhao, Xiang & Li, Juan & Niu, Peihua & Yang, Bo & Wu, Honglong & Wang, Wenling & Song, Hao & Huang, Baoying & Zhu, Na & Bi, Yuhai & Ma, Xuejun & Zhan, Faxian & Wang, Liang & Hu, Tao & Zhou, Hong & Hu, Zhenhong & Zhou, Weimin & Zhao, li & Tan, Wenjie. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *The Lancet*. 395. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., & Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in Escherichia coli. *Journal of virology*, 67(8), 4566–4579. <https://doi.org/10.1128/JVI.67.8.4566-4579.1993>

- Maghodia AB, Geisler C, Jarvis DL (2021) A new Bacmid for customized protein glycosylation pathway engineering in the baculovirus-insect cell system. *ACS Chem Biol.* <https://doi.org/10.1021/acscchembio.0c00974>
- Martínez-Solís, M., Gómez-Sebastián, S., Escribano, J. M., Jakubowska, A. K., & Herrero, S. (2016). A novel baculovirus-derived promoter with high activity in the baculovirus expression system. *PeerJ*, 4, e2183. <https://doi.org/10.7717/peerj.2183>
- Martínez-Solís, M., Herrero, S., & Targovnik, A. M. (2019). Engineering of the baculovirus expression system for optimized protein production. *Applied microbiology and biotechnology*, 103(1), 113–123. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9474-7>
- Mengual Gómez, D. L., Belaich, M. N., Rodríguez, V. A., & Ghiringhelli, P. D. (2010). Effects of fetal bovine serum deprivation in cell cultures on the production of *An-ticarsia gemmatalis* multinucleopolyhedrovirus. *BMC biotechnology*, 10, 68. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-10-68>
- Miller DW, Safer P, Miller LK (1986). An insect baculovirus host-vector system for high-level expression of foreign genes. In: Setlow JK & Hollander A editors. *Genetic Engineering: Principles and Methods*. New York: Plenum Publishing Corp; 1986. p. 277–298.
- Miller L. K. (1989). Insect baculoviruses: powerful gene expression vectors. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 11(4), 91–95. <https://doi.org/10.1002/bies.950110404>
- Miller, L. K., Trimarchi, R. E., Browne, D., & Pennock, G. D. (1983). A temperature-sensitive mutant of the baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus defective in an early function required for further gene expression. *Virology*, 126(1), 376–380. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90487-7](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90487-7)
- O'Reilly, D. R., Miller, L. K. & Luckow, V. A. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. (Oxford University Press, 1994).
- O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. *Baculovirus expression vectors: A laboratory manual*. New York: Oxford University Press. Freeman and Company; 1992. p.47-50.
- Ojeda, Zaida & Rocha, Pedro & Calvache, Hugo. (2002). Baculovirus como insecticida biológico / Baculoviruses as biological insecticides. Palmas 0121-2923.23.27.

- Ono, C., Okamoto, T., Abe, T., & Matsuura, Y. (2018). Baculovirus as a Tool for Gene Delivery and Gene Therapy. *Viruses*, *10*(9), 510. <https://doi.org/10.3390/v10090510>
- Palmberger, D., Wilson, I. B., Berger, I., Grabherr, R., & Rendic, D. (2012). SweetBac: a new approach for the production of mammalianised glycoproteins in insect cells. *PloS one*, *7*(4), e34226. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034226>
- Palomares, Laura & Realpe-Quintero, Mauricio & Ramirez, Octavio. (2015). An Overview of Cell Culture Engineering for the Insect Cell-Baculovirus Expression Vector System (BEVS). https://doi.org/10.1007/978-3-319-10320-4_15
- Parsza, C. N., Gómez, D., Simonin, J. A., Belaich, M. N., & Ghiringhelli, P. D. (2021). Evaluation of the Nucleopolyhedrovirus of *Anticarsia gemmatalis* as a Vector for Gene Therapy in Mammals. *Current gene therapy*, *21*(2), 177–189. <https://doi.org/10.2174/1566523220999201217155945>
- Pearson, M. N., & Rohrmann, G. F. (2002). Transfer, incorporation, and substitution of envelope fusion proteins among members of the Baculoviridae, Orthomyxoviridae, and Metaviridae (insect retrovirus) families. *Journal of virology*, *76*(11), 5301–5304. <https://doi.org/10.1128/jvi.76.11.5301-5304.2002>
- Pennock, G. D., Shoemaker, C., & Miller, L. K. (1984). Strong and regulated expression of Escherichia coli beta-galactosidase in insect cells with a baculovirus vector. *Molecular and cellular biology*, *4*(3), 399–406. <https://doi.org/10.1128/mcb.4.3.399-406.1984>
- Potter KN, Li Y, Capra JD. Antibody production in insect cells, en: H.Y. Wang, T. Imanaka editors. Antibody expression and engineering. ACS Symposium Series; 1995. vol 604, p. 41-55.
- Rendie D, Wilson IBH, Paschinger, K. (2008). The Glycosylation Capacity of Insect Cells. *Croat Chem Acta*, **81**:7–21.
- Rohrmann GF. (2019). Baculovirus Molecular Biology. 4th edition. Bethesda (MD).
- Roldão, A., Vicente, T., Peixoto, C., Carrondo, M. J., & Alves, P. M. (2011). Quality control and analytical methods for baculovirus-based products. *Journal of invertebrate pathology*, *107 Suppl*, S94–S105.

- Sanyal, D., Chowdhury, S., Uversky, V. N. & Chattopadhyay, K. (2020). An exploration of the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain (RBD), a complex palette of evolutionary and structural features. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.05.31.126615>
- Schlaeger, E.J. Medium design for insect cell culture. (1996). *Cytotechnology* **20**, 57–70. <https://doi.org/10.1007/BF00350389>
- Schoeman, D., & Fielding, B. C. (2019). Coronavirus envelope protein: current knowledge. *Virology journal*, *16*(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1182-0>
- Shang, J., Ye, G., Shi, K., Wan, Y., Luo, C., Aihara, H., Geng, Q., Auerbach, A., & Li, F. (2020). Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*, *581*(7807), 221–224. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2179-y>
- Shin, Yun-Ji & König-Beihammer, Julia & Vavra, Ulrike & Schwestka, Jennifer & Kienzl, Nikolaus & Klausberger, Miriam & Laurent, Elisabeth & Gruber, Clemens & Vierlinger, Klemens & Hofner, Manuela & Margolin, Emmanuel & Weinhäusel, Andreas & Stöger, Eva & Mach, Lukas & Strasser, Richard. (2021). N-Glycosylation of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Is Important for Functional Expression in Plants. *Frontiers in Plant Science*. *12*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.689104>
- Slack, J., & Arif, B. M. (2007). The baculoviruses occlusion-derived virus: virion structure and function. *Advances in virus research*, *69*, 99–165. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(06\)69003-9](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(06)69003-9)
- Smith, G. E., Summers, M. D., & Fraser, M. J. (1983). Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector. *Molecular and cellular biology*, *3*(12), 2156–2165. <https://doi.org/10.1128/mcb.3.12.2156-2165.1983>
- Smith, I., Mc Callum, G. J., Sabljic, A. V., Marfia, J. I., Bombicino, S. S., Trabucchi, A., Iacono, R. F., Birenbaum, J. M., Vazquez, S. C., Minoia, J. M., Cascone, O., López, M. G., Taboga, O., Targovnik, A. M., Wolman, F. J., Fingerhann, M., Alonso, L. G., Valdez, S. N., & Miranda, M. V. (2021). Rapid and cost-effective process based

- on insect larvae for scale-up production of SARS-COV-2 spike protein for serological COVID-19 testing. *Biotechnology and bioengineering*, 118(10), 4129–4137. <https://doi.org/10.1002/bit.27889>
- Sokolenko, S., George, S., Wagner, A., Tuladhar, A., Andrich, J. M., & Aucoin, M. G. (2012). Co-expression vs. co-infection using baculovirus expression vectors in insect cell culture: Benefits and drawbacks. *Biotechnology advances*, 30(3), 766–781. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.01.009>
- Stadlbauer, D., Amanat, F., Chromikova, V., Jiang, K., Strohmeier, S., Arunkumar, G.A., Tan, J., Bhavsar, D., Capuano, C., Kirkpatrick, E., Meade, P., Brito, R.N., Teo, C., McMahon, M., Simon, V., Krammer, F., 2020. SARS-CoV-2 seroconversion in humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr. Protoc. Microbiol.* <https://doi.org/10.1002/cpmc.100>.
- Summers, M. D., & Anderson, D. L. (1972). Granulosis virus deoxyribonucleic acid: a closed, double-stranded molecule. *Journal of virology*, 9(4), 710–713. <https://doi.org/10.1128/JVI.9.4.710-713.1972>
- Summers, M. D., & Smith, G. E. (1978). Baculovirus structural polypeptides. *Virology*, 84(2), 390–402. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(78\)90257-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(78)90257-x)
- Tanaka, T. Manufacturing Pharmaceutical-Grade Interferons Using Silkworm- Baculovirus System. *J. Biotechnol. Biomater.* (2012) <https://doi.org/10.4172/2155-952x.s9-002>
- Targovnik, A. M., Ferrari, A., Mc Callum, G. J., Arregui, M. B., Smith, I., Bracco, L. F., Alfonso, V., López, M. G., Martínez-Solís, M., Herrero, S., & Miranda, M. V. (2019). Highly efficient production of rabies virus glycoprotein G ectodomain in Sf9 insect cells. *3 Biotech*, 9(11), 385. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1920-4>
- Targovnik, A. M., Simonin, J. A., Mc Callum, G. J., Smith, I., Cuccovia Warlet, F. U., Nugnes, M. V., Miranda, M. V., & Belaich, M. N. (2021). Solutions against emerging infectious and noninfectious human diseases through the application of baculovirus technologies. *Applied microbiology and biotechnology*, 105(21-22), 8195–8226. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11615-1>

- ThermoFisher Scientific. (2015). Bac-to-Bac® Baculovirus Expression System. An efficient site-specific transposition system to generate baculovirus for high-level expression of recombinant proteins. (MAN0000414). Recuperado de: www.thermofisher.com
- Tian, J. H., Patel, N., Haupt, R., Zhou, H., Weston, S., Hammond, H., Logue, J., Portnoff, A. D., Norton, J., Guebre-Xabier, M., Zhou, B., Jacobson, K., Maciejewski, S., Khatoon, R., Wisniewska, M., Moffitt, W., Kluepfel-Stahl, S., Ekechukwu, B., Papin, J., Boddapati, S., ... Smith, G. (2021). SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice. *Nature communications*, 12(1), 372. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20653-8>
- Tjia, S. T., zu Altschiltsche, G. M., & Doerfler, W. (1983). *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) DNA does not persist in mass cultures of mammalian cells. *Virology*, 125(1), 107–117. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(83\)90067-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(83)90067-3)
- Tweeten KA, Bulla LA, Consigli RA. (2021). Characterization of an Extremely Basic Protein Derived from Granulosis Virus Nucleocapsids. *J Virol*; 33:866-876. <https://doi.org/10.1128/jvi.33.2.866-876.1980>
- Van Oers, M. M., & Vlak, J. M. (1997). The baculovirus 10-kDa protein. *Journal of invertebrate pathology*, 70(1), 1–17. <https://doi.org/10.1006/jipa.1997.4675>
- Van Oers, M. M., Pijlman, G. P., & Vlak, J. M. (2015). Thirty years of baculovirus-insect cell protein expression: from dark horse to mainstream technology. *The Journal of general virology*, 96(Pt 1), 6–23. <https://doi.org/10.1099/vir.0.067108-0>
- Vaughn, J. L., Goodwin, R. H., Tompkins, G. J., & McCawley, P. (1977). The establishment of two cell lines from the insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In vitro*, 13(4), 213–217. <https://doi.org/10.1007/BF02615077>
- Villafañe, L., Vaulet, L. G., Viere, F. M., Klepp, L. I., Forrellad, M. A., Bigi, M. M., Romano, M. I., Magistrelli, G., Fermepin, M. R., & Bigi, F. (2021). Development and evaluation of a low cost IgG ELISA test based in RBD protein for COVID-

19. *Journal of immunological methods*, 500, 113182. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.jim.2021.113182>
- Volkman, L. E., & Goldsmith, P. A. (1985). Mechanism of neutralization of budded *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus by a monoclonal antibody: Inhibition of entry by adsorptive endocytosis. *Virology*, 143(1), 185–195. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(85\)90107-2](https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90107-2)
- Volkman, L. E., Goldsmith, P. A., Hess, R. T., & Faulkner, P. (1984). Neutralization of budded *Autographa californica* NPV by a monoclonal antibody: identification of the target antigen. *Virology*, 133(2), 354–362. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(84\)90401-x](https://doi.org/10.1016/0042-6822(84)90401-x)
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T., & Velesler, D. (2020). Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 181(2), 281–292.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
- Walsh G. (2018). Biopharmaceutical benchmarks 2018. *Nature biotechnology*, 36(12), 1136–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.4305>
- Wang, C. Y., Li, F., Yang, Y., Guo, H. Y., Wu, C. X., & Wang, S. (2006). Recombinant baculovirus containing the diphtheria toxin A gene for malignant glioma therapy. *Cancer research*, 66(11), 5798–5806. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4514>
- Watanabe, Y., Allen, J. D., Wrapp, D., McLellan, J. S., & Crispin, M. (2020). Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science (New York, N.Y.)*, 369(6501), 330–333. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
- Wu, Y., Wu, Y., Hui, T., Wu, H., Wu, Y., & Wang, W. (2013). Reaper homologue IBM1 in silkworm *Bombyx mori* induces apoptosis upon baculovirus infection. *FEBS letters*, 587(6), 600–606. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.072>
- Wyatt GR. The biochemistry of insect hemolymph. *Annu Rev Entomol* 1961; 6:75.
- Xu, X. G., Wang, Z. S., Zhang, Q., Li, Z. C., Ding, L., Li, W., Wu, H. Y., Chang, C. D., Lee, L. H., Tong, D. W., & Liu, H. J. (2012). Baculovirus as a PRRSV and PCV2 bivalent vaccine vector: baculovirus virions displaying simultaneously GP5

glycoprotein of PRRSV and capsid protein of PCV2. *Journal of virological methods*, 179(2), 359–366. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.11.023>

Yang, J., Wang, W., Chen, Z., Lu, S., Yang, F., Bi, Z., Bao, L., Mo, F., Li, X., Huang, Y., Hong, W., Yang, Y., Zhao, Y., Ye, F., Lin, S., Deng, W., Chen, H., Lei, H., Zhang, Z., Luo, M., ... Wei, X. (2020). A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature*, 586(7830), 572–577. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2599-8>

Zanotto, P. M., Kessing, B. D., & Maruniak, J. E. (1993). Phylogenetic interrelationships among baculoviruses: evolutionary rates and host associations. *Journal of invertebrate pathology*, 62(2), 147–164. <https://doi.org/10.1006/jipa.1993.1090>

Zeng, R., Ruan, H. Q., Jiang, X. S., Zhou, H., Shi, L., Zhang, L., Sheng, Q. H., Tu, Q., Xia, Q. C., & Wu, J. R. (2004). Proteomic analysis of SARS associated coronavirus using two-dimensional liquid chromatography mass spectrometry and one-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis followed by mass spectroemtric analysis. *Journal of proteome research*, 3(3), 549–555. <https://doi.org/10.1021/pr034111j>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., Tan, W., & China Novel Coronavirus Investigating and Research Team (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *The New England journal of medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>