

PROYECTO DE INVESTIGACION FINAL

FORMULACIONES MEJORADAS DE PROTEASAS VIRALES PARA SU USO EN LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Autor/es:

Scarponi Lobosco, Ignacio – LU 1103800

Carrera:

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

PhD Alonso, Leonardo

Co-tutor:

Lic. Vadillo, Martín

Año: 2025

PROYECTO FINAL DE BIOTECNOLOGÍA

**FORMULACIONES MEJORADAS DE PROTEASAS
VIRALES PARA
SU USO EN LA OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS
RECOMBINANTES**

Scarponi Lobosco, Ignacio – LU 1103800

Licenciatura en Biotecnología

Tutor:

**Dr. Alonso, Leonardo Gabriel
Laboratorio de Nanobiotecnología
Facultad de Farmacia y Bioquímica
Universidad de Buenos Aires**

Co-Tutor:

**Lic. Vadillo, Martin Javier
Facultad de Ingeniería y Ciencias Exactas
Universidad Argentina De la Empresa**

09/09/2025

UADE

**UNIVERSIDAD ARGENTINA DE LA EMPRESA
FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS EXACTAS**

Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron conmigo durante todo el tiempo que estuve en la carrera.

A Leo por ser mi tutor, por toda la paciencia y los conocimientos transmitidos durante estos años, y por la confianza para realizar este proyecto.

A toda la gente del laboratorio NANOBIOTEC por integrarme al grupo y su calidez, por hacer que este proyecto sea llevadero al reinos de las cosas del día a día, y por ampliar mi conocimiento de lo que se puede hacer con la ciencia. En especial a Luciano, Shadia y Gervasio por enseñarme todo lo que aprendí durante mi tiempo en el laboratorio y por aclarar todas las dudas que tuve. Son el mejor grupo de laboratorio que alguien podría pedir.

A UADE y sus profesores por darme todas la herramientas y conocimientos para poder formarme como biotecnólogo, en especial a Martin Vadillo y Diana Acosta por toda su ayuda durante la carrera y por permitirme desarrollarme profesionalmente.

A mi familia que me acompañó y motivó durante todos estos años, en especial a mi padres, Flabio y Rosana, y mi hermana, Luz, por estar siempre cuando los necesitaba y motivarme en los momentos complicados. Sin su apoyo esto no sería posible.

A todos los amigos que hice en la facultad por todos estos años, materias y mates compartidos. En especial, a mi grupo “Los Bioalcohólicos” que hicieron de estos últimos años muy especiales para mi, por tener gente con la cual quejarme y disfrutar de las materias que cursamos, nunca pensé que iba disfrutar tanto la facultad hasta que los conocí. Muchas gracias por su amistad.

A mis amigos del secundario, Leandro, Ailen y Mariana, que me acompañan desde la secundaria y que me vieron desde el inicio como me adentraba en el mundo de la biotecnología. Siempre voy a apreciar todos los momentos que pasamos juntos.

Resumen

En los procesos de obtención de proteínas recombinantes pueden surgir diferentes problemas, como la obtención de producto mal plegado, sin actividad biológica o en cantidades insuficientes debido a su toxicidad para el organismo productor. Con el objetivo de mejorar el rendimiento en la producción de proteínas recombinantes, se diseñaron distintas estrategias, una de ellas es la obtención de una proteína de fusión o quimera. En este enfoque, se obtiene la proteína de interés unida mediante un conector o “linker” al extremo de otra proteína con propiedades beneficiosas que mitigan problemas como el mal plegado, baja solubilidad, toxicidad o simplificar su purificación. Una de las desventajas de esta estrategia es que puede, según el uso del producto proteico, requerir un paso adicional para separar la proteína de interés de la otra proteína a través de la digestión con una proteasa. Esto se logra mediante la inclusión de una secuencia de corte (secuencia de aminoácidos) para una proteasa específica en el conector o linker. La proteasa a utilizar debe ser específica (cortar solo en un único sitio), resistente a distintas condiciones de entorno y poseer una alta actividad enzimática, todas características que cumple la proteasa del Virus del Grabado del Tabaco conocida como TEVp (Tobacco Etch Virus protease). El presente trabajo tiene como objetivo desarrollar un proceso productivo para la proteasa TEV y el mejoramiento de su actividad enzimática frente a sustratos complejos mediante el uso de diferentes excipientes. Con este objetivo utilizamos la bacteria *E.coli* BL21, cultivada en medio LB (Luria-Bertani) con ampicilina (100 µg/mL) como antibiótico de selección. La expresión se indujo con IPTG 0,4 mM y la purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad IMAC, seguida de una columna preparativa de exclusión molecular S-200, utilizando el equipo ÄKTA system. Como sustrato complejo se utilizó un constructo de MBP-CCNA2(Δ171) en *E.coli* C41, cultivado en medio LB con ampicilina (100 µg/mL). La inducción se realizó con IPTG 0,4 mM y la purificación se realizó mediante cromatografía de afinidad por columna de amilosa y luego utilizando la misma columna de exclusión molecular, de la cual se recolectó la fracción oligomerizada. Entre los excipientes probados, ninguno mejoró la actividad enzimática significativamente frente a sustratos complejos, aunque la mayoría no afectó significativamente la actividad de la proteasa. Por lo tanto, estos excipientes podrían ser útiles

para mejorar la solubilidad y estabilidad del producto en casos en los que este sea inestable
luego del corte.

Abstract

IMPROVED FORMULATIONS OF VIRAL PROTEASES FOR USE IN THE PRODUCTION OF RECOMBINANT PROTEINS

In the process of obtaining recombinant proteins, many problems may arise, like obtaining a misfolded product, one without biological activity or in insufficient quantities due to toxicity to the host. With the aim of improving the yield of recombinant protein production, many strategies have been designed, one of them is the obtention of a fusion protein or chimera. In this approach, the protein of interest is connected through a connector or linker to the end of other proteins with beneficial properties that help mitigate problems like misfolding, low solubility, toxicity or to simplify the purification process. One of the downsides of this approach is that it may need, depending on the usage of the product, an additional step to separate the protein of interest off the other protein through digestion with a protease. This is done with the inclusion of a recognition sequence (a sequence of amino acids) of a specific protease in the connector's sequence or linker. This protease needs to be specific (to cut the specific sequence), resistant to different environmental conditions and to have a high enzymatic activity, all of these characteristics fulfilled by the Tobacco Etch Virus protease (commonly known as TEVp). The present work has as objectives the development of a productive process for the TEV protease and the improvement of its enzymatic activity against complex substrates with the usage of different excipients. To achieve this, we used *E.coli* BL21, cultivated in LB (Luria-Bertani) broth with ampicillin (100 µg/mL) as a selection antibiotic. The expression was induced with 0.4 mM IPTG and the purification was done through IMAC affinity chromatography, followed by size-exclusion chromatography with an S-200 preparative column, using an ÄKTA system. A construct of MBP-CCNA2(Δ171) in *E.coli* C41 and cultivated in LB broth with ampicillin 100 µg/mL was used as the complex substrate. The expression was induced with 0.4 mM IPTG and the purification was done through amylose affinity chromatography, followed by size-exclusion chromatography with an S-200 preparative column, in which it was picked the oligomerized fraction. Among the excipients tested, none significantly improved enzymatic activity against the complex substrate, even though most of them did not significantly affect the protease. So,

these excipients could be useful for improving the solubility or stability of the product in cases where it is unstable after digestion.

Contenido

Agradecimientos.....	1
Resumen.....	2
Abstract.....	4
Contenido.....	6
Introducción.....	8
1.1. Virus del Grabado del tabaco (Tobacco etch virus).....	8
1.1.1. Origen de la proteasa TEVp.....	8
1.1.2. Estructura proteica de TEVp.....	9
1.1.3. Especificidad de la secuencia de TEVp.....	10
1.1.4. Condiciones de reacción de TEVp.....	11
1.2. Excipientes.....	12
1.2.1. Categorías de excipientes.....	12
2. Antecedentes.....	20
3. Descripción.....	21
4. Objetivos.....	22
4.1. Objetivo general.....	22
4.2. Objetivos específicos.....	22
5. Metodología de Desarrollo.....	23
5.1. Expresión y purificación de la proteína MBP-TEVp.....	23
5.2. Expresión y purificación de la proteína MBP-fHcp100.....	25
5.3. Puesta a punto de la digestión de MBP-fHcp100 con TEVp.....	27
5.3.1. Relación de TEVp:MBP-fHcp100 y tiempo de digestión.....	27
5.3.2. Cinética enzimática frente a MBP-fHcp100.....	27
5.4. Ensayos con excipientes.....	28
5.5. Expresión y purificación de MBP-CCNA2(Δ171).....	28

5.6. Puesta a punto de la digestión de MBP-CCNA2(Δ171) con TEVp.....	30
5.6.1. Relación de TEVp:MBP-CCNA2(Δ171) y tiempo de digestión.....	30
5.6.2. Cinética enzimática frente a MBP-CCNA2(Δ171).....	31
5.7. Ensayos con excipientes.....	31
5.8. Electroforesis de proteínas.....	32
5.9. Cuantificación de proteínas.....	32
5.10. Análisis de imágenes.....	32
6. Resultados.....	34
6.1. Expresión y purificación de la proteína MBP-TEVp.....	34
6.2. Expresión y purificación de la proteína MBP-fHcp100.....	39
6.3. Puesta a punto de la digestión de MBP-fHcp100 con TEVp.....	42
6.4. Digestión de MBP-fHcp100 con distintos excipientes.....	45
6.5. Expresión y purificación de la proteína MBP-CCNA2(Δ171).....	48
6.6. Puesta a punto de la digestión de MBP-CCNA2(Δ171) con TEVp.....	52
6.7. Digestión de MBP-CCNA2(Δ171) con distintos excipientes.....	54
7. Discusión.....	57
8. Conclusión.....	61
9. Bibliografía.....	62
10. Anexos.....	72

Introducción

1.1. Virus del Grabado del tabaco (Tobacco etch virus)

1.1.1. Origen de la proteasa TEVp

La proteasa TEV (TEVp) es una proteasa viral de 27 kDa proveniente del Virus del Grabado del Tabaco (Tobacco Etch Virus, TEV), que pertenece al grupo Potyvirus de la familia *Potyviridae*. El genoma de TEV está compuesto por una cadena simple positiva de RNA con 9500 nucleótidos (Allison et al., 1986; Hari, 1981). Esta cadena de RNA da origen, mediante la utilización de la maquinaria celular para la traducción, una cadena polipeptídica única de 3054 aminoácidos (o 346 kDa) que origina 10 proteínas gracias a la acción combinada de tres proteasas (P1, HC-Pro y NIa) (Fig. 1).

De las 3 proteasas, P1 y HC-Pro se autoclivan del extremo amino terminal de la poliproteína. En cambio, la proteína de inclusión nuclear a (NIa) juega un rol fundamental en la obtención de los productos del genoma de TEV. De esta poliproteína de 49 kDa se origina una proteína VPg (Viral Protein genome-linked o Proteína Viral ligada al genoma) de 21 kDa y una proteasa (TEVp) de 27 kDa (Allison et al., 1986; Parks et al., 1995).

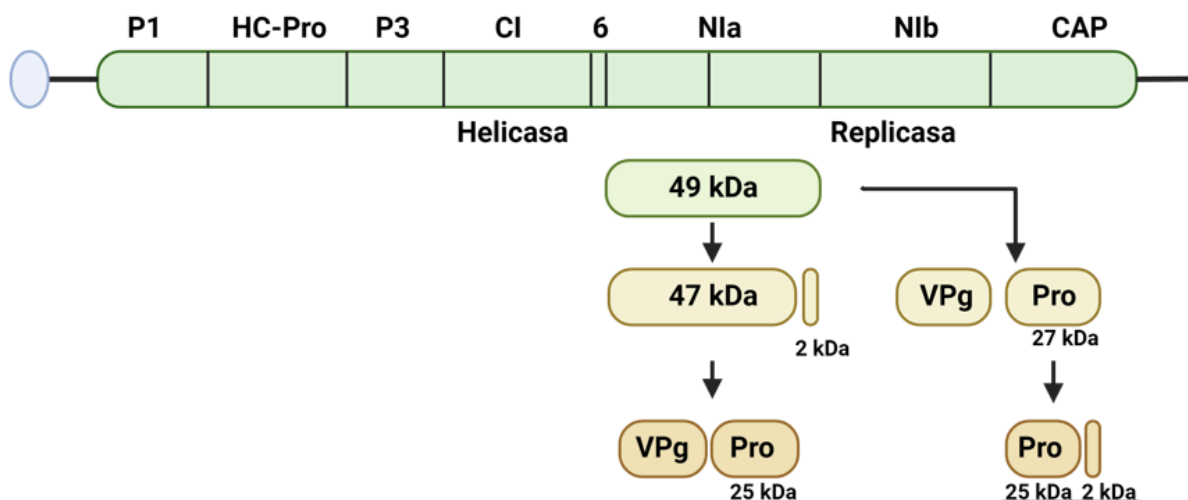


Figura 1: Mapa genómico del Tobacco Etch Virus y sus productos. P1 y P3: Proteínas 1 y 3; HC-Pro: Componente ayudante de transmisión de áfidos con actividad proteasa; CI: Proteína de inclusión citoplasmática con actividad helicasa; NIa y NIB: Proteína de inclusión nuclear a

y b; CAP: Proteína de cápside; VPg: Proteína viral ligada al genoma; Pro: Proteasa TEV (TEVp). En la TEVp *wild type* ocurre un auto clivaje que produce una proteasa truncada de 25 kDa con actividad catalítica disminuida (Adaptado de Parks et al., 1995).

1.1.2. Estructura proteica de TEVp

La proteasa TEVp es una cisteína-proteasa, posee una estructura perteneciente al grupo de proteasas tipo 3C, esto significa que su estructura es similar a las serina-proteasas (como tripsina y quimotripsina), pero la TEVp utiliza una cisteína en vez de una serina en su sitio activo. Analizando su estructura terciaria, esta posee 2 dominios con una estructura del tipo barril beta antiparalelos (Fig. 2) que están presentes en la serina-proteasas (Phan et al., 2002). Actualmente se la clasifica como cisteína-proteasa según el sistema de clasificación de proteasas MEROPS [MEROPS Clan PA(C), family C4].

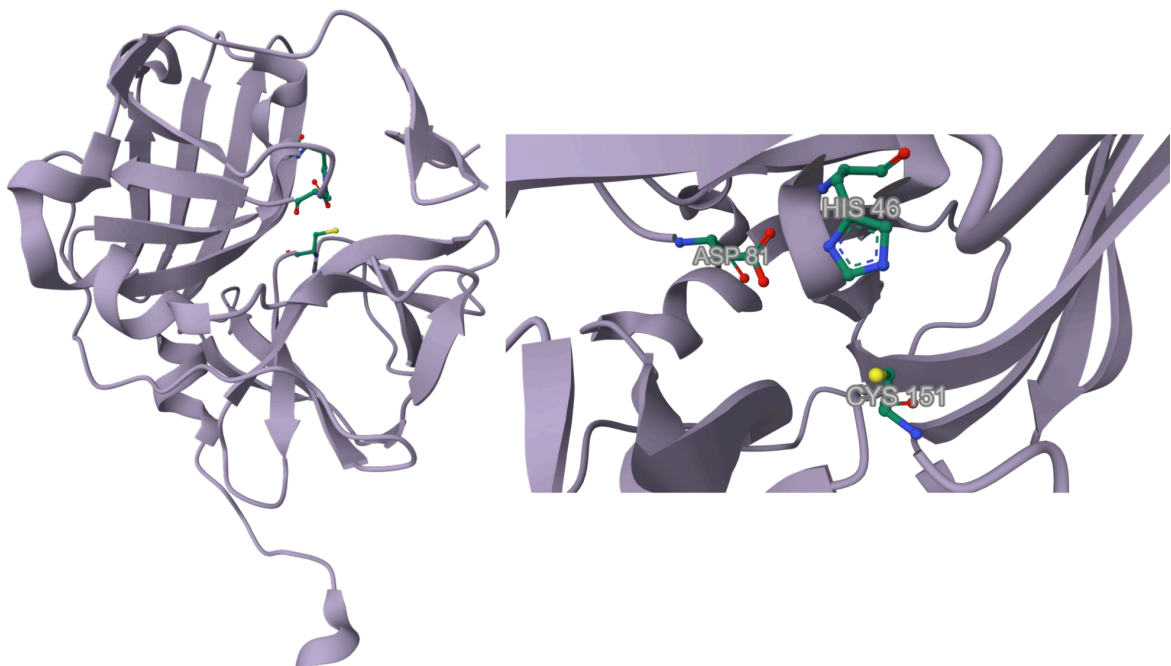


Figura 2: Modelo de cinta de la estructura de la proteasa TEV(S219D) (izquierda) y la tríada catalítica de la misma (derecha). Los residuos de la tríada se modelaron en formato barras y

esferas para visualizarse en la estructura (Verde: Carbono, Azul: Nitrógeno, Amarillo: Sulfuro, Rojo: Oxígeno).

En las cisteína-proteasas, la ruptura del enlace peptídico es llevada a cabo por una tríada catalítica por los aminoácidos His, Asp y Cis. En el caso de la TEVp la tríada es llevada a cabo por His46, Asp81 y Cis151, los cuales están presentes entre los barriles beta antiparalelos (Phan et al., 2002).

La TEVp salvaje experimenta una autólisis que resulta en una proteasa truncada con actividad disminuída (Figura 1). Esta auto escisión ocurre luego del residuo 218 del extremo C terminal, en un región que no coincide con la secuencia consenso de corte ni con sus variantes (Parks et al., 1995; Phan et al., 2002). Esto se debe a que el extremo C terminal tiene una estructura flexible, lo que permite que el enlace peptídico entre Met218 y Ser219 se encuentre cerca del sitio activo cuando no hay presencia de sustrato. El extremo C terminal libre puede interactuar con el sitio activo de la proteasa en una especie de mecanismo de autoinhibición (Nunn et al., 2005). A través de mutagénesis dirigida, se han desarrollado distintas variantes de la TEVp en las que se sustituye Ser219 por otros aminoácidos (S219V, S219D) para disminuir el movimiento del enlace peptídico y, de este modo, obtener una variante más resistente a autoproteólisis (Phan et al., 2002, 2002).

1.1.3. Especificidad de la secuencia de TEVp

Los productos proteicos maduros de TEV provienen de una única poliproteína precursora, cuyo procesamiento es llevado a cabo principalmente por una proteasa viral de 27 kDa (TEVp). Esta proteasa reconoce el motivo de secuencia conservado E-X-X-Y-X-Q/(S-G) (en X pueden ir diferentes residuos), por lo que el corte de la poliproteína entre la glutamina (Q) y la serina (S) o glicina (G) da lugar a que alguno de estos residuos se convierta en el nuevo extremo N-terminal (Carrington et al., 1988; Dougherty et al., 1988).

El efecto que tienen los cambios en los residuos de las diferentes posiciones de la secuencia de reconocimiento en la actividad enzimática de la TEVp han sido estudiados en profundidad. Los residuos se numeran en relación con la proximidad al enlace que se escinde y se denominan P1, P2, P3, P4, P5 y P6 (Fig. 3). Mediante estudios cristalográficos se ha

demostrado que los residuos en las posiciones P6, P4, P3, P2, P1 y P1' interactúan directamente con el sitio de unión a sustrato, mientras que el residuo en la posición P5 es el único que está expuesto al solvente, lo que permite la presencia de la mayoría de los aminoácidos sin afectar la actividad enzimática (Dougherty et al., 1989; Phan et al., 2002).

Una de las ventajas por la cual se opta por la TEVp es que tiene una gran tolerancia a los cambios de residuo en la posición P1', lo cual se debe a su bolsillo S1', el cual expone parcialmente la cadena lateral al solvente en lugar de estar contenida en el complejo. Esto permite obtener extremos N-terminales con distintos residuos (Kapust et al., 2002; Phan et al., 2002). De todas las combinaciones de residuos posibles, la secuencia óptima de clivaje es E-N-L-Y-F-Q/S-G (Fig. 3), esta misma está presente entre los fragmentos N1b y CAP de la poliproteína (Boulware et al., 2010).



Figura 3: Diagrama de la secuencia de corte de la TEVp.

1.1.4. Condiciones de reacción de TEVp

Una de las ventajas de la TEVp es su tolerancia a diversas condiciones de reacción y su estabilidad en presencia de diferentes excipientes. La enzima mantiene una actividad similar en un rango de pH entre 6 y 9 (Parks et al., 1995), y muestra una mayor actividad a temperaturas de 30-34°C, aunque retiene aproximadamente un 50 % de su actividad a temperatura ambiente (20°C) y un 10% a 4°C, mientras que su actividad disminuye a temperaturas superiores a 34°C (Nallamsetty et al., 2004).

El *buffer* estándar para la digestión *in vitro* es buffer Tris-HCl 50 mM pH=8,0, EDTA 0,5 mM, DTT 1 mM. Se ha demostrado que conserva parte de su actividad en distintos buffers de purificación por columna de afinidad, como los utilizados para etiquetas de

poli-histidina (Buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH=8,0; NaCl 0,3 M; imidazol 300 mM), MBP (Buffer Tris-HCl 20 mM, pH=7,4; NaCl 0,2 M; EDTA 1 mM; DTT 1 mM; maltosa 10 mM), GST (Buffer Tris-HCl 50 mM, pH=8,0; glutatión reducido 10 mM) y Strep-tag (Buffer Tris-HCl 50 mM, pH=8,0; NaCl 0,15 M; EDTA 1 mM; destiobiotina 2,5 mM) (Sun et al., 2012).

Aunque en el buffer estándar no se utilizan sales, se le suele agregar 0,2 M de NaCl, y puede tolerar concentraciones de hasta 2 M. Se reportó que resiste diferentes concentraciones de agentes desnaturalizantes como urea (2M), cloruro de guanidinio (2M), 2-mercaptoetanol (0.7 M) y SDS (1%) (Cabrita et al., 2007; Fang et al., 2013; Sun et al., 2012). También soporta concentraciones de excipientes como EGTA, etilenglicol, Triton X-100, Tween 20%, NP-40 y CHAPS. Además, la proteasa es insensible a inhibidores de serina-proteasas, como PMSF, AEBSF, TLCK, bestatina y pepstatina. Por otro lado, es muy sensible a agentes alcalinizantes que reaccionan con cisteínas, como N-etilmaleimida, yodoacetamida y Zn^{2+} 5 mM, ya que estos interactúan con cisteínas e histidinas (Dougherty et al., 1988, 1989).

1.2. Excipientes

1.2.1. Categorías de excipientes

Buffers

Los buffer o soluciones tampón tienen como función principal mantener el pH de una solución, este mismo puede afectar la ionización de las cadenas laterales de los aminoácidos, la conformación y estructura de una proteína, impactando en su actividad biológica.

El rol que tiene el pH en la estructura de las proteínas es importante para los niveles secundarios, terciarios y cuaternarios de organización estructural, ya que puede afectar la interacción entre aminoácidos. Algunos de estos tienen en sus cadenas laterales grupos ionizables con pKas característicos (por ejemplo, la lisina y la arginina poseen en sus cadenas laterales grupos aminos con pKas de 10,5 y 12,4, respectivamente). Las interacciones iónicas entre grupos cargados, como los grupos aminos y carboxilos de los aminoácidos, se ven

afectadas por el pH. Por lo tanto, el cambio de pH puede alterar la carga de estos grupos y, en consecuencia, los enlaces que estabilizan la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de las proteínas (Dill, 1990). Además, existen grupos laterales lábiles que, a pHs extremos, pueden modificarse, lo que conduce a un cambio en la estructura primaria. Por ejemplo, en pHs básicos, los residuos de asparagina pueden deamidar, introduciendo un ácido aspártico o ácido iso-aspártico en lugar de la asparagina original (Pace et al., 2013; Pikal et al., 1991).

Además de las interacciones iónicas, los puentes de hidrógenos, claves en la estabilización de estructuras secundarias como hélices alfa y láminas beta, también se ven afectados por cambios en el pH, modificando así la estabilidad y conformación de la proteína (Dill, 1990). En casos extremos, las proteínas pueden alcanzar un punto de desnaturalización en la cual se altera de forma irreversible su estructura y función.

El punto isoeléctrico (pI) es el pH específico en el que una proteína tiene una carga neta cero. En este pH, la solubilidad de la proteína disminuye debido al equilibrio entre las fuerzas atractivas y repulsivas, lo que puede llevar a su precipitación o agregación (Dill, 1990; Fu et al., 2010; Takano et al., 2000).

Al modificarse la organización de una proteína, también se modifica su función e interacción con sustratos o ligandos. Cada enzima una tiene un pH óptimo donde su actividad catalítica es máxima y, al alejarse de este rango, la actividad puede disminuir drásticamente. Por ejemplo, la pepsina, una enzima producida en el estómago, tiene su mayor actividad en un pH entre 1,5 y 2,5, y se desactiva de forma permanente a un pH de 5,0 (Tang, 2004). Además, el cambio del pH puede afectar los residuos de los aminoácidos del sitio activo, alterando su afinidad por distintas biomoléculas, como ocurre con la afinidad de la hemoglobina por el oxígeno en condiciones de pH inferior al fisiológico (conocido como efecto Bohr) (Berenbrink, 2011).

Los buffers compuestos por acetato, citrato, tris y fosfato permiten regular una amplio rango de pH (de 3 a 10), y su interacción con las proteínas varía considerablemente dependiendo de la naturaleza del ion y de la proteína con la que interactúan (Fig.4) (Akers et al., 2002; Katayama et al., 2006; Zheng & Janis, 2006). Los buffers también pueden variar su pH en función de la temperatura o tras ciclos de congelado-descongelado (Stoll & Blanchard, 1990).

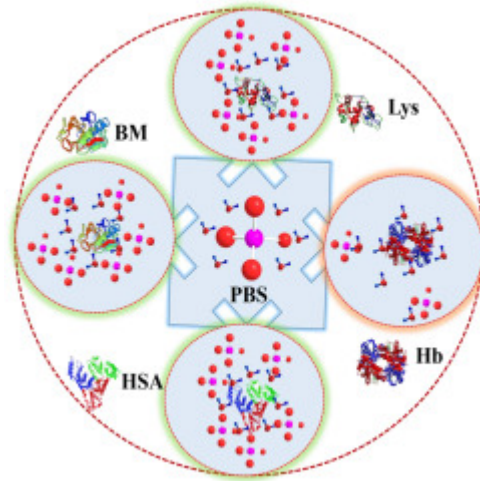


Figura 4: Diagrama que representa la interacción de PBS con distintas proteínas. En el diagrama se destaca que el buffer fosfato (PBS) mejora la estabilidad térmica de la lisozima (Lys) en comparación con hemoglobina (Hb) al formar capas alrededor de la proteína (Sacado de Pavani et al., 2021).

Sales

La sal tiene varios efectos importantes en las proteínas que pueden influir en su estructura y función. Los iones afectan la fuerza iónica como mecanismo general, pero también pueden interactuar diferencialmente, dependiendo del tipo de catión y anión, con las biomoléculas.

En concentraciones bajas, la sal puede aumentar la solubilidad de las proteínas en soluciones acuosas (conocido como fenómeno *salting in*). Esto se debe a que los iones de sal interactúan con las cargas superficiales de la proteína, disminuyendo las interacciones hidrofóbicas con el agua y entre proteínas, lo que termina estabilizando las zonas hidrofóbicas de una proteína y mejorando su solubilidad. Por ejemplo, se observó que el agregado de NaCl disminuyó la tasa de agregación de proteínas recombinantes, como KGF (Factor de Crecimiento de Queratinocitos) y FVIII SQ (Factor de Coagulación VIII variante SQ) (Fatouros & Sjöström, 2000; Zhang et al., 1995).

En mayores concentraciones, la sal puede llevar a la precipitación de proteínas (salting out). Este fenómeno ocurre debido a que los iones de sal saturan las cargas superficiales de la proteína y empiezan a competir con las proteínas por la interacción con el agua, aumentando las interacciones proteína-proteína e induciendo la precipitación. Este fenómeno se utiliza en métodos de purificación de proteínas, como en la técnica de "Salting Out". Por ejemplo, el agregado de sal aumenta la agregación de rhG-CSF (Factor Estimulante de Colonias Granulocitos recombinante humano) (Chi et al., 2003).

Como se mencionó antes, la sal, en bajas concentraciones, puede estabilizar la estructura de algunas proteínas al interactuar con grupos cargados en la superficie de las proteínas, lo que puede ayudar a mantener su estructura. Existen compuestos que, en altas concentraciones, conducen a la desnaturalización proteica, denominados agentes desnaturalizantes, al inducir la ruptura de enlaces no covalentes (como puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals) que mantienen la estructura tridimensional de la proteína, lo que puede llevar a la pérdida de su actividad biológica (Arakawa & Timasheff, 1984; Goto & Fink, 1989). Los agentes caotrópicos más conocidos, pero no los únicos, son el cloruro de guanidinio y la urea.

En general, los efectos que puede producir una sal en una proteína pueden asignarse a la serie de Hofmeister, la cual es una clasificación de propiedades físicas de iones en una solución acuosa, como su capacidad para precipitar proteínas (Fig. 5). Además, se descubrió que también tienen un efecto en la estabilidad de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas, en especial los aniones (Gokarn et al., 2011; Kunz et al., 2004).

Los iones se dividen en cosmotrópicos (izquierda de la serie) y caotrópicos (derecha de la serie). Los iones cosmotrópicos tienden a precipitar proteínas, prevenir su despliegue al disminuir la solubilidad de los grupos hidrofóbicos y aumentar la interacción hidrofóbica. En cambio, los iones caotrópicos tienden a solubilizar proteínas y promover su despliegue al aumentar la solubilidad de grupos hidrofóbicos y disminuir la interacción hidrofóbica (Thomas & Elcock, 2007).

En resumen, el efecto de la sal en las proteínas es amplio y depende de la concentración y tipo de la sal, el tipo de proteína y las condiciones del medio. El efecto de la sal debe probarse empíricamente para cada sistema proteico.

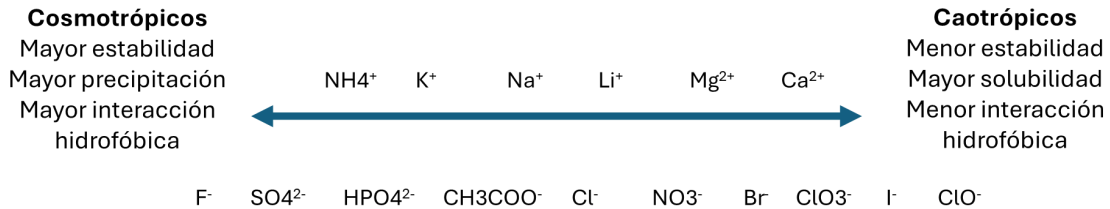


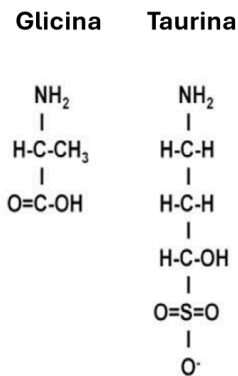
Figura 5: Diagrama de la serie de Hofmeister.

Osmolitos

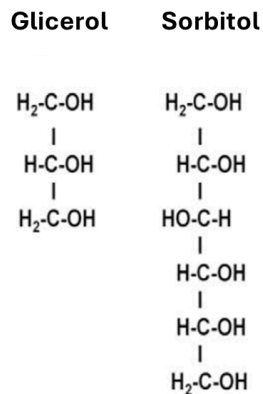
Los osmolitos son solutos intracelulares orgánicos presentes en microorganismos que los ayudan frente a condiciones de estrés al estabilizar termodinámicamente a las proteínas, mejorar su solubilidad y participar en el plegamiento de estas.

Se observó que gran parte de los osmolitos tienen un efecto de hidratación diferencial en el estado nativo y, con ello, favorecen el plegamiento de proteínas (Arakawa & Timasheff, 1985; Kumar, 2009). Los osmolitos se clasifican en metilaminas, polioles y aminoácidos y sus derivados (Fig. 6). Los osmolitos más utilizados para estabilizar proteínas en fórmulas líquidas y liofilizadas son sacarosa, trehalosa, sorbitol y glicina, aunque hay otros osmolitos que tienen aplicaciones más limitadas (Kumar, 2009).

Aminoácidos y derivados



Polioles



Oxido de amina

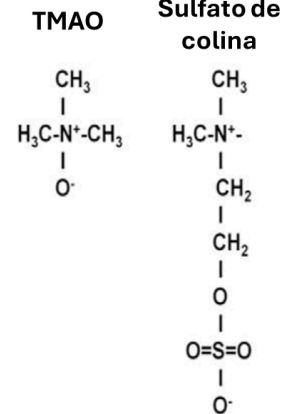


Figura 6: Diagramas con ejemplos de los 3 mayores grupos de osmolitos (Adaptado de Kumar, 2009).

Hidratos de carbono/Sacáridos

Los hidratos de carbono son frecuentemente utilizados en formulaciones farmacéuticas debido a sus propiedades estabilizantes. Se estudió cómo diferentes sacáridos (y otros osmolitos) son utilizados en la naturaleza por microorganismos al enfrentarse a condiciones de estrés para mejorar la solubilidad y estabilizar la estructura de proteínas, favoreciendo su correcto plegamiento. Estos azúcares afectan las proteínas a través de la hidratación preferencial del estado nativo en fórmulas líquidas y la formación de matrices cristalinas, en fórmulas liofilizadas (Bhatnagar et al., 2007; Chang et al., 2005; Kim et al., 2003; Olgenblum et al., 2023).

Aunque hay una gran variedad de sacáridos en la naturaleza, muchos de estos pueden reaccionar con distintos residuos de las proteínas y causar su desnaturalización o modificación, reduciendo la variedad de sacáridos utilizables (Banks et al., 2009). Por ejemplo, los azúcares pueden reaccionar con las proteínas mediante la reacción de Maillard (Tarelli et al., 1994), donde un azúcar reductor (como la glucosa o la fructosa) se une a un grupo amino de un aminoácido. Esta interacción forma un compuesto llamado "base de Schiff", modificando covalentemente la proteína.

La sacarosa y la trehalosa (Fig. 7) son dos disacáridos conocidos por su capacidad de estabilizar proteínas en fórmulas líquidas y liofilizadas. Ambos son considerados estabilizadores debido a su naturaleza no reductora, su resistencia a sufrir hidrólisis, su baja cristalización al variar la temperatura y su capacidad de absorber humedad sin cristalizar (Singh, 2018).

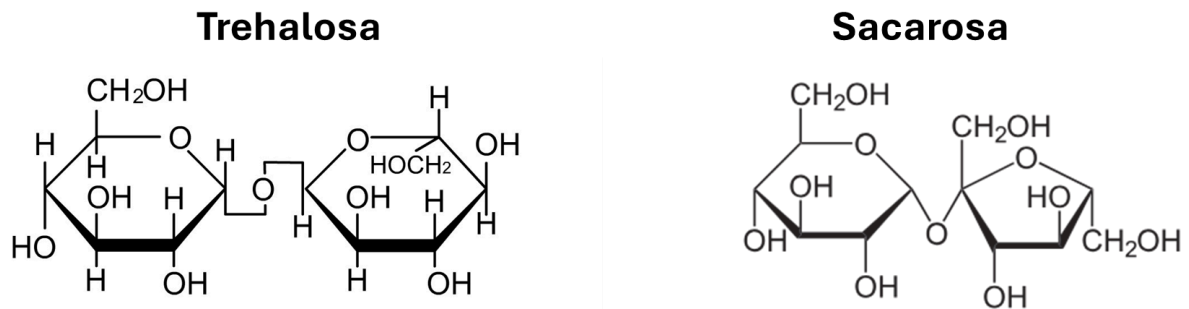


Figura 7: Estructura de los disacáridos trehalosa y sacarosa.

Surfactantes

Los tensioactivos, también conocidos como surfactantes, son sustancias que influyen en la tensión superficial de la interfase entre dos fases diferentes (líquido/líquido, líquido/gas o líquido/sólido). Los más conocidos y utilizados en formulaciones parenterales son los polisorbatos 20 y 80 (también conocidos como Tween 20 y 80) (Fig. 8), debido a que evitan la agregación de proteínas por agitación y estrés por liofilización y congelación.

Estos tienen la capacidad de competir con las proteínas por las superficies hidrofóbicas en interfaces aire-agua y evitar que pierdan su estructura nativa. Estas pueden bloquear la adsorción de proteínas a superficies hidrofóbicas y, al mismo tiempo, interactuar con las regiones hidrofóbicas de las mismas proteínas (Kamerzell et al., 2011).

Tanto con proteínas en su estado nativo como en su estado no plegado, los surfactantes pueden influir en la estabilidad conformacional de las proteínas a través de interacciones diferenciales. En la mayoría de los casos, la interacción diferencial con proteínas no plegadas disminuye la estabilidad del estado nativo, mientras que la interacción diferencial con el estado nativo aumenta la energía libre de desnaturalización y favorece dicho estado. Dicho lo anterior, los surfactantes pueden inhibir la agregación de proteínas en interfaces. Además, se observó que estos funcionan como chaperonas químicas al aumentar la tasa de repliegamiento de proteínas. (Bam et al., 1998; Chi et al., s. f.).

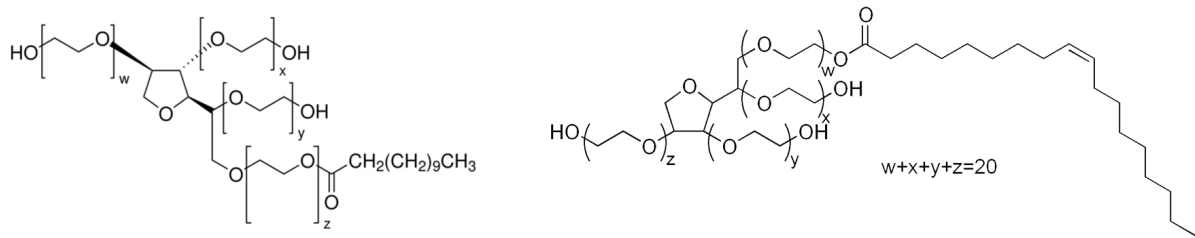


Figura 8: Estructura de Tween 20 (Izquierda) y 80 (Derecha).

Aminoácidos

Existen diferentes aminoácidos con distintas características que afectan la estabilidad de las proteínas, ya que tienen la capacidad de actuar como buffers y/o antioxidantes. Asimismo, pueden interactuar con una proteína a través de hidratación diferencial y mediante enlaces no covalentes (Arakawa, Ejima, et al., 2007; Arakawa, Tsumoto, et al., 2007).

Dentro de los aminoácidos existentes, los más utilizados son la histidina, la arginina y la glicina (Fig. 9). La histidina se utiliza en muchas ocasiones como buffer y también puede estabilizar a la proteína al interactuar de forma no covalente (Chen et al., 2003; Wade & Tucker, 1998). La glicina es utilizada en formulaciones líquidas y liofilizadas debido a su capacidad de actuar como buffer (Pyne & Suryanarayanan, 2001; Tian et al., 2007). Por su parte, el aminoácido más utilizado en la estabilización de proteínas es la arginina. Este es un aminoácido particular, ya que tiene propiedades interesantes para el área de la biotecnología, donde se emplea con frecuencia en los procesos de replegamiento y para evitar la agregación de proteínas (Arakawa, Ejima, et al., 2007; Nakakido et al., 2009).



Figura 9: Estructuras de los aminoácidos glicina, histidina y arginina.

2. Antecedentes

Se ha descrito (Tropea et al., 2009) un método simple y escalable para producir una TEVp mutante (S219V) soluble utilizando *Escherichia coli* (***E.coli***) como sistema de expresión, en el que se agregó un *tag* (etiqueta) de 6 histidinas en el extremo N-terminal para poder purificar hasta homogeneidad por cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) con resina Ni-NTA y cromatografía de exclusión molecular. En el diseño del plásmido se incluyó la secuencia de la proteasa junto con la proteína de unión a maltosa (MBP) en el extremo C-terminal para mejorar la solubilidad de esta y que se acumule en forma soluble en el citoplasma en vez de en cuerpos de inclusión. En la región conectora o linker entre estas dos proteínas se incluyó un sitio de clivaje para TEVp, y el autoprosesamiento de esta “quimera” ocurre previo al proceso de purificación.

Otros grupos desarrollaron procesos similares en los que se utilizan diferentes diseños del proceso, pero se conserva la etapa de purificación por IMAC. En Raran-Kurussi et al. (2017) se diseñó una secuencia de TEVp (unida al extremo C-terminal de MBP) en el que se introdujeron tres mutaciones (L56V, S135G y S219V), las cuales confieren mayor estabilidad y solubilidad a la proteasa, permitiendo obtener un rendimiento de 42-50 mg/L de cultivo. El grupo de Enrique-Flores y colaboradores obtienen una proteasa con siete mutaciones (S219V, T17S, N68D, I77V, L56V, S135G y la eliminación de 5 aminoácidos del extremo C-terminal) con un rendimiento de ~55 mg/L de cultivo (Enríquez-Flores et al., 2022).

El uso de excipientes en procesos de eliminación de *tags* de purificación no es nuevo. Otros trabajos demostraron que la presencia de ciertos excipientes mejora la estabilidad del producto proteico obtenido y permite una mayor exposición de la secuencia de corte, aumentando el rendimiento de corte de proteasas (Shahravan et al., 2008). En reiteradas investigaciones se probó la capacidad de TEVp de resistir la presencia de excipientes que inhiben la actividad de otras proteasas (Cabrita et al., 2007; Fang et al., 2013; Lundbäck et al., 2008; Sun et al., 2012). También se observó que la presencia de estos puede mejorar la solubilidad del producto de interés luego de la digestión, aunque no se analizó si mejora el rendimiento la proteasa, permitiendo obtener mayor cantidad de producto (Lee et al., 2019).

3. Descripción

Como se mencionó anteriormente, la proteasa TEV (TEVp) es una proteína que reconoce a la secuencia de aminoácidos Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln/Gly (E-N-L-Y-F-Q/G). Gracias a la técnica de mutación dirigida, se pudieron obtener diferentes variantes de la proteasa que tienen mayor actividad catalítica, estabilidad, solubilidad, adaptabilidad a cambios en la secuencia de corte o resistencia en presencia de diferentes reactivos, en comparación con proteasa salvaje (proveniente de la secuencia del virus de referencia) o *wild type*.

Una de las claves de su actividad es el acceso al sitio de corte por parte de la proteasa, lo cual representa una de las dificultades más significativas frente a blancos con una estructura “compleja”; por ejemplo aquellas proteínas oligoméricas donde el sitio de corte puede ocultarse del solvente. Por ello, el desarrollo de formulaciones con excipientes de diferentes naturalezas permitiría mejorar la actividad frente a este tipo de blancos y, así, obtener mayores rendimientos de la proteína de interés. Estas formulaciones podrían implementarse en los protocolos de digestión de blancos que se sepan que tienden a oligomerizar o tengan una estructura compleja que oculte la secuencia de corte.

Para analizar el efecto de los excipientes en la actividad enzimática se utilizarán 2 sustratos que varían en su complejidad estructural (simple y complejo). Como sustrato simple se utilizó un constructo que tiene un sitio de corte de TEVp entre las proteínas MBP y un fragmento de Hcp100 (fHcp100), esta última, debido a su corta secuencia aminoacídica, no formaría una estructura tridimensional que evite la exposición de la secuencia de corte y, por lo tanto, que produzca un impedimento estérico para la proteasa. Como sustrato complejo se utilizó otro constructo cuya secuencia de corte no está expuesta debido a que se encuentra entre las proteínas MBP y CCNA2(Δ 171), esta última, debido a que tiene una estructura que tiende oligomerizarse y formar especies de distinto peso molecular, produce un mayor impedimento estérico para la proteasa y disminuye la eficacia de la misma.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general

El objetivo general es obtener la TEVp en forma recombinante, con alta pureza química y conformacional, y desarrollar formulaciones de corte que mejoren la performance de esta proteasa frente a sustratos complejos.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener en forma recombinante la TEVp a partir de un cultivo de *E.coli*.
- Purificar la proteína hasta homogeneidad mediante técnicas cromatográficas.
- Analizar su pureza química, conformacional y su actividad específica.
- Ensayar excipientes que estabilicen la proteasa en condiciones adversas de corte o frente a sustratos parcialmente resistentes al clivaje

5. Metodología de Desarrollo

5.1. Expresión y purificación de la proteína MBP-TEVp

5.1.1. Crecimiento bacteriano

Inicialmente se contaba con un clon productor, transformado con un plásmido (pRK793-TEVp-S219V) de expresión, que codifica para la proteína TEVp quimera descrita anteriormente, almacenado en crioviales a -80 °C. Con el objetivo de lograr la expresión recombinante de la TEVp, se incubó a 37 °C durante la noche (ON) en una placa con medio LB agar con ampicilina (100 µg/mL), inoculada con el stock bacteriano a -80°C de *E.coli* BL21 mencionado anteriormente.

Luego de crecer la placa hasta el día siguiente, se inoculó un tubo de ensayo con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C, 200 RPM, 5 h. Como control de crecimiento negativo, se utilizó un tubo con el mismo medio sin inocular. Pasadas las 5 horas, se trasvasó la mitad del contenido a cada uno de dos erlenmeyers con 50 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C, 200 RPM, ON. Los medios inoculados se trasvasaron a 2 erlenmeyers con 950 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C, 200 RPM. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ 0,6-0,8, se indujo con IPTG 0,4 mM y se incubó a 30 °C, 200 RPM, 4 h.

Previo y posterior a la inducción (tiempo 2 y 6 horas), se tomó una muestra representativa para evaluar el nivel de expresión. Para ello, se centrifugó una muestra de los cultivos a 13.000 RPM por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet bacteriano recuperado se le agregó 25 uL de buffer de carga reductor 1X (Buffer Tris-HCl 50 mM pH=6,8; SDS 2 % (m/v); glicerol 6 % (v/v); DTT 2 mM; azul de bromofenol 0,01 % (m/v)) y se incubó a 95 °C por 5 minutos, previo a su resolución en un SDS-PAGE.

Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 6.000 RPM en una centrífuga RC-5C-Plus (Sorvall), utilizando un rotor GSA con capacidad para mamaderas de 500 ml a 4 °C por 20 min. Los pellets recuperados fueron resuspendidos en dH₂O y guardados a -80 °C.

5.1.2. Lisis celular

Con el fin de extraer la TEVp soluble, se utilizó el método de lisis por sonicación. Las bacterias recolectadas se resuspendieron en buffer de lisis (Buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH=8,0; NaCl 200 mM; glicerol 10 % v/v; imidazol 25 mM) y se sonicaron a 30 % de potencia, con ciclos de 10/10 seg ON/OFF durante 10 min a 4 °C, en un equipo Vibra-Cell™ VC 505 (Sonic & Material, Inc.). Para separar las fracciones del homogenato, se centrifugó a 10.000 RPM, 4 °C, 30 min utilizando la centrífuga RC-5C-Plus (Sorvall) con el rotor SS-34. Se separaron las fracciones soluble (que contiene la TEVp) e insoluble.

5.1.3. Purificación por cromatografía de afinidad IMAC

Con el objetivo de purificar la TEVp, se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad IMAC. Se utilizó una columna con resina Ni-NTA Nuvia™ (Bio-Rad), la cual fue sanitizada con una solución de urea 8,0 M y H_2O destilada (dH_2O) para eliminar cualquier residuo que hubiese quedado de corridas anteriores. Posteriormente, se equilibró con 6 volúmenes de buffer de lavado (Buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH=8,0; NaCl 200 mM; glicerol 10 % v/v; imidazol 25 mM). Luego, se sembró la fracción soluble, se lavó con buffer de lavado hasta reducir la carga proteica y, finalmente, se eluyó con buffer de elución (Buffer $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 50 mM pH=8,0; NaCl 200 mM; glicerol 10 % v/v; imidazol 250 mM). Para la sanitización de la columna, se utilizó una solución de urea 8,0 M, seguida de dH_2O y guardada en EtOH 20% v/v, a 4 °C. El flujo de las soluciones utilizadas fue controlado mediante una bomba peristáltica (GE Healthcare).

5.1.4. Purificación por cromatografía de exclusión molecular

Con la intención de obtener la TEVp soluble y homogénea conformacionalmente, se utilizó la técnica de cromatografía por exclusión molecular (SEC). Esta técnica nos permite separar la proteína TEVp monomérica de las especies oligomerizadas que naturalmente se producen durante el proceso de purificación. Se utilizó una columna con resina Superdex 200 Prep Grade (Cytiva) y el cromatógrafo ÄKTAPurifier (GE Healthcare). En todo el proceso, se trabajó con un flujo operativo de 1,0 mL/min y se

configuró para una presión máxima de 0,5 MPa/5 bars. Las soluciones utilizadas en todo el proceso fueron previamente filtradas con un filtro de 0,45 μm .

La columna, almacenada en EtOH 20 % v/v, fue lavada con dH₂O y equilibrada con buffer de columna (Buffer Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ 50 mM pH=8,0; NaCl 200 mM; glicerol 10% v/v). Previo a la inyección de la muestras, esta fue centrifugada a 13.000 RPM, 30 min, 4 °C. Luego de la siembra, las distintas fracciones de la muestra se recolectaron en tubos estériles a 4 °C hasta el final del proceso y, finalmente, guardados a -80 °C. Al terminar su uso, la columna fue lavada con dH₂O y guardada en EtOH 20 % v/v a temperatura ambiente.

5.1.5. Análisis de actividad enzimática de fracciones

Con el fin de identificar la fracción con la mayor actividad enzimática de las distintas fracciones obtenidas, se tomaron 50 μg de sustrato MBP-fHcp100 y se la llevó a 50 μL de volumen final con buffer de digestión utilizando una relación 1:200 (TEVp:MBP-fHcp100 m/m) por 4 h a 30°C. A esta mezcla se le agregó 0,25 μg de las distintas fracciones obtenidas de la purificación de la proteasa TEV por SEC, previamente cuantificadas por ensayo de Bradford.

La reacción se incubó a 30°C, y se tomaron 5 μL de muestra a las 4 hs para evaluar el porcentaje de corte del sustrato de cada fracción. Estos 5 μL se llevaron a 20 μL con dH₂O, se les agregó 5 μL de buffer de carga reductor 5X (Buffer Tris-HCl 250 mM pH=6,8; SDS 10 % (m/v); glicerol 30 % (v/v); DTT 10 mM; azul de bromofenol 0,05 % (m/v)) y se incubaron a 95 °C por 5 min, previo a su resolución en un gel SDS-PAGE.

5.2. Expresión y purificación de la proteína MBP-fHcp100

5.2.1. Crecimiento bacteriano

Con el objetivo de expresar la proteína MBP-fHcp100, la cual se utilizará como uno de los sustratos de prueba de la TEVp, se sembró e incubó a 37 °C ON en una placa con medio LB agar con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) una alícuota del stock bacteriano almacenado en un criovial a -80°C de *E.coli* BL21 DE3 transformadas con el plásmido pMAL-c5E-fHcp100.

Al día siguiente, se inoculó un tubo de ensayo con medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubó a 37 °C, 200 RPM, ON. Como control, se utilizó un tubo con el mismo medio sin inocular. Se trasvasó la mitad del contenido a cada uno de dos erlenmeyers con 50 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C, 200 RPM, 5 h. Pasadas las 5 horas, los medios inoculados se trasvasaron a dos erlenmeyers con 450 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37 °C, 200 RPM. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ 0,6-0,8, se indujo con IPTG 0,5 mM y se incubó a 28 °C, 200 RPM, ON.

Previo y posterior a la inducción (tiempo 2 y 16 horas), se centrifugó una muestra representativa para evaluar el nivel de expresión. Para ello, se centrifugó una muestra de los cultivos a 13.000 RPM por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet bacteriano recuperado se le agregó 25 µL de buffer de carga reductor 1X e incubó a 95°C por 5 minutos, previo a su resolución en un SDS-PAGE.

Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 6.000 RPM en centrífuga RC-5C-Plus (Sorvall) utilizando un rotor GSA con capacidad para mamaderas de 500 ml a 4 °C por 20 min. Los pellets recuperados fueron resuspendidos en dH₂O y guardados a -80 °C.

5.2.2. Lisis celular

Con el fin de extraer la proteína MBP-fHcp100, se utilizó el método de lisis por sonicación. Las bacterias recolectadas se resuspendieron en buffer de lisis (Buffer Tris-HCl pH=8,0 20 mM; PMSF 3 mM) y se sonicaron a 30% potencia, con ciclos de 5/10 seg ON/OFF durante 10 min a 4°C, en un equipo Vibra-Cell™ VC 505 (Sonic & Material, Inc.). Para separar las fracciones del homogenato, se centrifugó a 10.000 RPM, 4°C, 30 min utilizando la centrífuga Sorvall RC-5C-Plus (Sorvall) con el rotor SS-34. Se separaron las fracciones soluble e insoluble.

5.2.3. Purificación por cromatografía de afinidad con columna de amilosa

Con la finalidad de purificar la proteína MBP-fHcp100, se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad con columna de amilosa. Se utilizó una columna con resina Dextrin Sepharose High Performance (Cytiva), la cual fue lavada con dH₂O y equilibrada con buffer

de lavado (Buffer Tris-HCl pH=8,0 20 mM; NaCl 150 mM). Luego, se sembró la fracción soluble, se lavó con buffer de lavado hasta reducir la carga proteica y, finalmente, se eluyó con buffer de elución (Buffer Tris-HCl pH=8,0 20 mM; NaCl 150 mM; maltosa 20 mM). Para la sanitización de la columna, se utilizó el restante del buffer de lavado y elución, seguido de una solución SDS 0,1% m/v y guardada en solución SDS 0,1% m/v, EtOH 20% v/v, a 4 °C. El flujo de las soluciones utilizadas fue controlado mediante una bomba peristáltica (GE Healthcare).

5.3. Puesta a punto de la digestión de MBP-fHcp100 con TEVp

5.3.1. Relación de TEVp:MBP-fHcp100 y tiempo de digestión

Con el objetivo de definir la relación óptima de TEVp con respecto al sustrato a utilizar en los futuros ensayos, se tomaron 50 µg de MBP-fHcp100 y se llevó a 50 uL de volumen final con buffer de digestión (Buffer Tris-HCl pH=8,0 25 mM; NaCl 150 mM; DTT 5 mM). A esta mezcla se agregaron distintas cantidades de TEVp con el fin de obtener diferentes relaciones de proteasa/sustrato (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600 m/m).

La reacción se incubó a 30°C, y se tomaron 5 µL de muestra a las 4 y 20 hs para evaluar el nivel de corte del sustrato en cada relación y el tiempo de digestión. Estos 5 µL se llevaron a 20 µL con dH₂O, se les agregó 5 µL de buffer de carga reductor 5X y se incubaron a 95 °C por 5 min, previo a su resolución en un gel SDS-PAGE.

5.3.2. Cinética enzimática frente a MBP-fHcp100

Con el fin de obtener datos sobre la cinética de la proteasa frente a MBP-fHcp100, se tomaron 50 µg de MBP-fHcp100 y se llevó a 50 uL de volumen final con buffer de digestión. A cada condición se le agregó 0,25 µg de TEVp para obtener una relación de 1:200 m/m (TEVp:MBP-fHcp100), la relación óptima determinada en ensayos previos.

Se incubó a 30 °C y se tomaron 5 µL de muestra a los 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 240 min para obtener una curva enzimática. Los 5 µL se llevaron a 20 µL con dH₂O, se les

agregó 5 μ L de buffer de carga reductor 5X y se incubaron 95 °C por 5 min, previo a su resolución en un SDS-PAGE.

5.4. Ensayos con excipientes

Con el objetivo de analizar el efecto que tiene la presencia de distintos excipientes a la actividad enzimática de TEVp, se tomaron 50 μ g de MBP-fHcp100 y se llevó a 90 μ L de volumen final con buffer de digestión y distintas soluciones con diferentes concentraciones de excipientes. A cada condición se le agregó 0,25 μ g de TEVp para obtener una relación de 1:200 m/m (TEVp:MBP-fHcp100). Se utilizaron como excipientes arginina, NaCl, sacarosa, trehalosa, tritón X-100, tween 20 y urea.

Se incubaron a 30 °C durante 34 min. Se tomaron 8 μ L de muestra, se llevaron a 20 μ L con dH₂O, se les agregó 5 μ L de buffer de carga reductor 5X y se las llevó a 95 °C por 5 min, previo a su resolución en un SDS-PAGE.

5.5. Expresión y purificación de MBP-CCNA2(Δ 171)

5.5.1. Crecimiento bacteriano

Con el objetivo de expresar la proteína MBP-CCNA2(Δ 171), se sembró e incubó a 37°C ON en una placa con medio LB agar con ampicilina (100 μ g/mL) una muestra del stock bacteriano a -80 °C de *E.coli* C41 que contenían el plásmido pMAL-c5x-CCNA2(Δ 171).

Al día siguiente, se inoculó un tubo de ensayo con medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37 °C, 200 RPM, 5 h. Como control, se utilizó un tubo con el mismo medio sin inocular. Pasadas las 5 horas, se trasvasó la mitad del contenido a cada uno de dos erlenmeyers con 50 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se dejó incubando a 37 °C, 200 RPM, ON. Los medios inoculados se trasvasaron a 2 erlenmeyers con 950 mL de medio LB con ampicilina (100 μ g/mL) y se incubaron a 37°C, 200 RPM. Cuando el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ 0,6-0,8, se indujo con IPTG 0,4 mM y se incubó a 25°C, 200 RPM, 4 h.

Previo y posterior a la inducción (tiempo 0 y 4 horas), se tomó una muestra representativa para evaluar el nivel de expresión. Para ello, se centrifugó una muestra de los cultivos a 13.000 RPM por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. El pellet bacteriano recuperado se le agregó 25 μ L de buffer de carga reductor 1X y se incubó a 95 °C por 5 minutos, previo a su resolución en un SDS-PAGE

Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 6.000 RPM en centrífuga Sorvall RC-5C-Plus (Sorvall), utilizando un rotor GSA con capacidad para mamaderas de 500 ml a 4 °C por 20 min. Los pellets recuperados fueron resuspendidos en dH₂O y guardados a -80 °C.

5.5.2. Lisis celular

Con el fin de extraer la proteína MBP-CCNA2(Δ 171), se utilizó el método de lisis por sonicación. Las bacterias recolectadas se resuspendieron en buffer de lisis (Buffer Tris-HCl pH=7,4 25 mM; NaCl 150 mM; DTT 2 mM; MgCl₂ 100 mM; Glicerol 5% v/v) y sonicaron a 30% potencia, con ciclos de 10/10 seg ON/OFF durante 10 min a 4 °C, en un equipo Vibra-Cell™ VC 505 (Sonic & Material, Inc.). Para separar las fracciones del homogenato, se centrifugó a 10.000 RPM, 4 °C, 30 min utilizando la centrífuga Sorvall RC-5C-Plus (Sorvall) con el rotor SS-34. Se separaron las fracciones soluble e insoluble.

5.5.3. Purificación por cromatografía de afinidad con columna de amilosa

Con la finalidad de purificar la proteína MBP-CCNA2(Δ 171) se utilizó la técnica de cromatografía de afinidad con columna de amilosa. Se utilizó una columna con resina Dextrin Sepharose High Performance (Cytiva) la cual fue lavada con dH₂O y equilibrada con buffer de lavado (Buffer Tris-HCl pH=7,4 25 mM; NaCl 150 mM; DTT 2 mM; MgCl₂ 25 mM; Glicerol 5% v/v), luego se sembró la fracción soluble y se lavó con buffer de lavado hasta reducir la carga proteica y finalmente se eluyó con buffer de elución (Buffer Tris-HCl pH=7,4 25 mM; NaCl 150 mM; DTT 2 mM; MgCl₂ 100 mM; Glicerol 5% v/v; Maltosa 20 mM). Para la sanitización de la columna se utilizó el restante del buffer de

lavado y elución, seguido de SDS 0,1% m/v y guardado en SDS 0,1% m/v, EtOH 20% v/v a 4°C. El flujo de las soluciones utilizadas fue controlado a través de una bomba peristáltica (GE Healthcare).

5.5.4. Purificación por cromatografía de exclusión molecular

Con el fin de obtener la proteína MBP-CCNA2(Δ 171) en su estado oligomerizado, se utilizó la técnica de cromatografía de exclusión molecular. Se utilizó una columna preempacada HiLoad Superdex 200 pg preparative (Cytiva) y el equipo ÄKTA Purifier (GE Healthcare). En todo el proceso, se trabajó con un flujo operativo de 1,0 mL/min y se configuró para que la presión máxima sea de 0,5 MPa/5 bars. Las soluciones utilizadas en todo el proceso fueron previamente filtradas con un filtro de 0,45 μ m.

La columna, almacenada en EtOH 20% v/v, fue lavada con dH₂O y equilibrada con buffer de columna (Buffer Tris-HCl pH=7,4 25 mM; NaCl 150 mM; MgCl₂ 100 mM; Glicerol 5% v/v). Previo a la inyección de la muestra, esta fue centrifugada a 13.000 RPM, 30 min, 4 °C. Luego de la siembra, las distintas fracciones de la muestra se recolectaron en tubos estériles a 4 °C hasta el final del proceso y, finalmente, se almacenaron a -80 °C. Al terminar su uso, la columna fue lavada con dH₂O y guardada en EtOH 20% v/v a temperatura ambiente.

5.6. Puesta a punto de la digestión de MBP-CCNA2(Δ 171) con TEVp

5.6.1. Relación de TEVp:MBP-CCNA2(Δ 171) y tiempo de digestión

Con el objetivo de definir la relación óptima de TEVp con respecto al sustrato a utilizar en los futuros ensayos, se tomó 50 μ g de MBP-CCNA2(Δ 171) y se llevó a 90 μ L de volumen final con buffer de digestión. A esta condición se agregaron distintas cantidades de TEVp con el fin de obtener distintas relaciones de proteasa/sustrato (1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 m/m).

La reacción se incubó a 30 °C y se tomaron 12,5 µL de muestra a las 4 hs para evaluar el nivel de corte del sustrato en cada relación y el tiempo de digestión. Estos 12,5 µL se llevaron a 20 µL con dH₂O, se les agregó 5 µL de buffer de carga reductor 5X y se incubaron a 95 °C por 5 min, previo a su resolución en un SDS-PAGE.

5.6.2. Cinética enzimática frente a MBP-CCNA2(Δ171)

Con el fin de obtener datos sobre la cinética de formación de producto, se tomó 50 µg de MBP-CCNA2(Δ171) y se llevó a 90 uL de volumen final con buffer de digestión. A esta condición se agregó 2,5 ug de TEVp para obtener una relación de 1:20 m/m (TEV:MBP-CCNA2(Δ171)), la relación óptima determinada en el ensayo anterior.

La reacción se incubó a 30 °C y se tomaron 12,5 µL de muestra a los 0, 5, 15, 30, 60, 120 y 240 min para obtener una curva enzimática. Estos 12,5 µL se llevaron a 20 µL con dH₂O, se les agregó 5 µL de buffer de carga reductor 5X y se incubaron a 95 °C por 5 min, previo a su resolución en un SDS-PAGE.

5.7. Ensayos con excipientes

Con el objetivo de analizar si la presencia de distintos excipientes mejoran la actividad enzimática de la TEVp, se tomó 50 µg de MBP-CCNA2(Δ171) y se llevó a 90 uL de volumen final con buffer de digestión y distintas soluciones con diferentes concentraciones de excipientes A cada condición se le agregó 2,5 µg de TEVp para tener una relación de 1:20 m/m (TEVp:MBP-CCNA2(Δ171)), la relación óptima determinada en el ensayo anterior. Se utilizaron como excipientes arginina, NaCl, sacarosa, trehalosa, Tritón X-100, Tween 20 y urea.

Se incubaron a 30 °C durante 56 min. Se tomaron 10 µL de muestra, se llevaron a 20 µL con dH₂O, se les agregó 5 µL de buffer de carga 5X y se las llevó a 95°C por 5 min previo a su resolución en un SDS-PAGE.

5.8. Electroforesis de proteínas

Con el fin de analizar el estado de las proteínas de las distintas muestras, se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida de 10%, 12% y 15% utilizando el sistema discontinuo SDS-PAGE (BioRad). A las muestras se les agregó buffer de carga 5X (azul de bromofenol 0,5% m/v, glicerol 50% v/v, SDS 10% m/v, β -mercaptoetanol 0,4 % v/v, buffer Tris-HCl 250 mM pH=6,8), llevándolo a 1X y luego realizando una incubación de 5 min a 95 °C. Al terminar la corrida, se incubó el gel en solución de tinción Coomasie Brilliant Blue R250 (Sigma) durante toda la noche. El patrón de peso molecular utilizado fue Marker de Proteínas (Productos Bio-Lógicos).

5.9. Cuantificación de proteínas

Con el objetivo de cuantificar las proteínas obtenidas en los procesos de purificación, se utilizó el método de Bradford. Para esto, se preparó una solución de trabajo de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA con la que se preparó una curva de calibración, utilizando 6 tubos con una concentración de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la solución de BSA, con un volumen final de 1 mL con dH_2O . Luego, agregar 200 μL de reactivo de Bradford (Bio-Rad) a los tubos, incubar por 5 minutos a temperatura ambiente y medir su OD_{595} para obtener una curva de calibración. Para la preparación de la muestra de interés se procedió con la misma metodología y, previo a su medición, se verificó que el color obtenido esté cercano al color del medio de la curva.

5.10. Análisis de imágenes

La intensidad de las bandas proteicas se midió mediante un análisis densitométrico utilizando el programa Image J 1.54d (NIH, Bethesda, USA). Con el fin de obtener el porcentaje de digestión de los diferentes ensayos, se midió la intensidad de la/s banda/s de interés y se la dividió por la densidad de todas las bandas de la calle para obtener la densidad relativa de la banda (1).

$$\textit{Densidad relativa de la banda} = \frac{\textit{Densidad de la banda de interés}}{\textit{Densidad de todas las banda de la calle}} \quad (1)$$

6. Resultados

6.1. Expresión y purificación de la proteína MBP-TEV_p

Con el objetivo de expresar TEV_p, se llevó a cabo un protocolo similar al diagrama (Fig. 10) en el cual se analizó la presencia y estado de TEV_p en las distintas etapas del proceso.

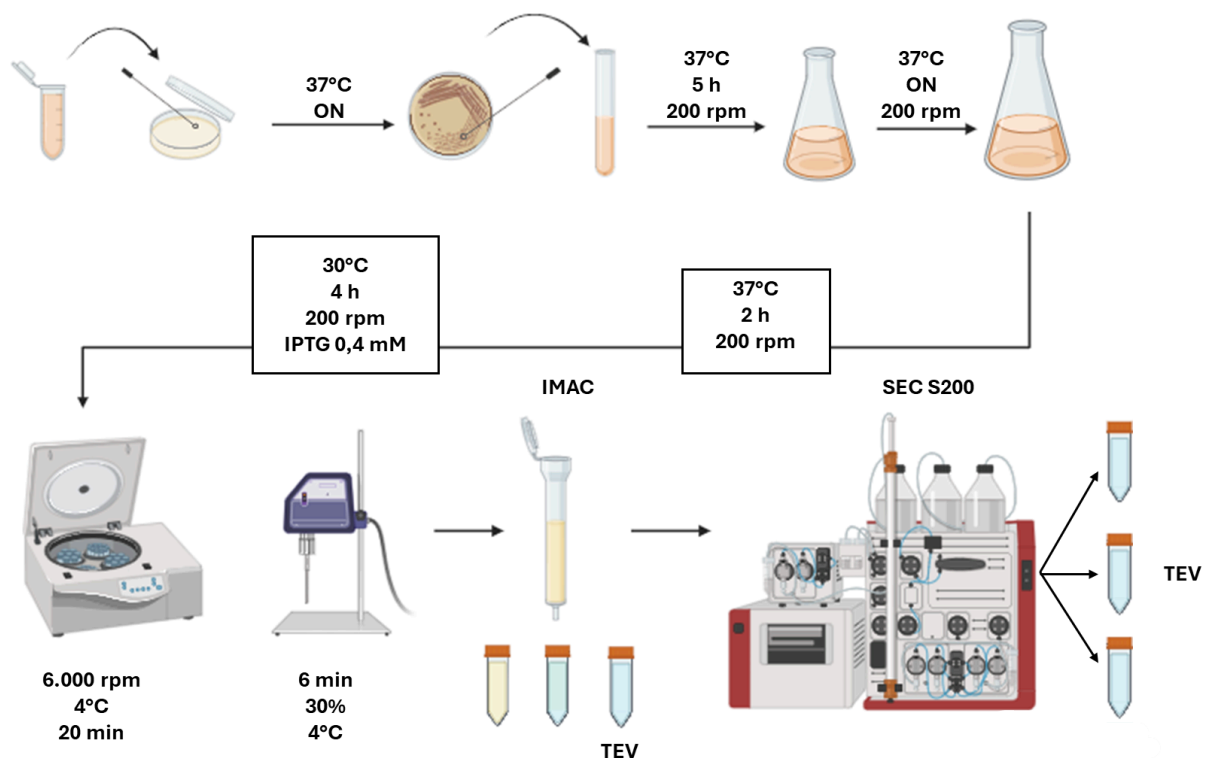


Figura 10. Diagrama de flujo del proceso de expresión y purificación de TEV_p. El proceso se desarrolló siguiendo las indicaciones de (Tropea et al., 2009).

En este proceso se utilizó la cepa BL21 de la bacteria *E.coli* con el plásmido pRK793 el cual contiene el gen de TEV_p mutante S219V unido a proteína MBP a través de la secuencia de corte de la TEV_p. Esta misma contiene una etiqueta de 6 histidinas en el N-terminal y una etiqueta de 5 argininas en el C-terminal (Fig. 11).

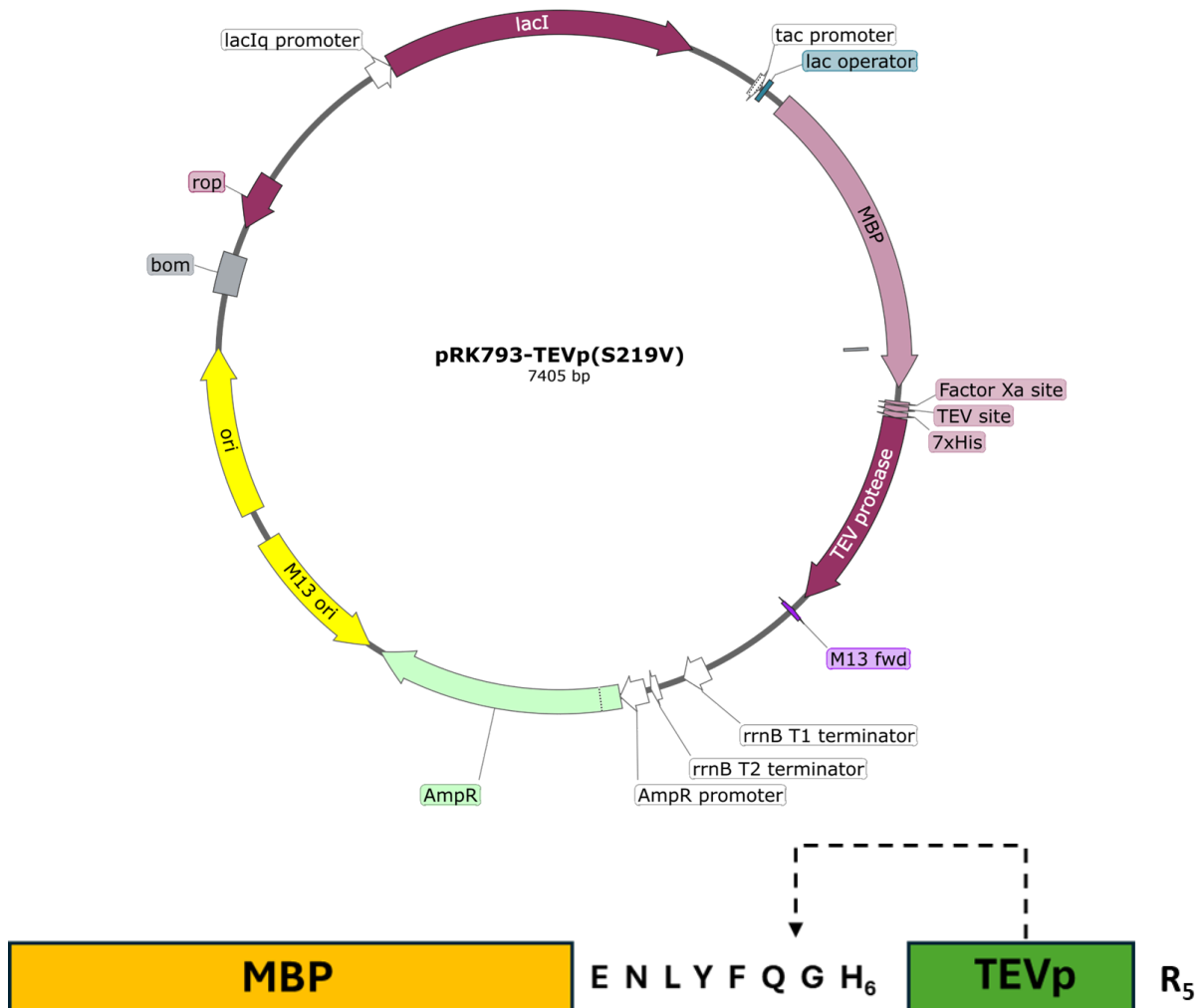


Figura 11: Diagrama del plásmido pRK793-TEV-S219V (Arriba) y del constructo del gen MBP-His6-TEVp(S219V)-Arg5 (Abajo) (Adaptado de Tropea et al., 2009).

La purificación de la His6-TEVp(S219V)-Arg5 en la fracción soluble del lisado bacteriano se realizó mediante una cromatografía de afinidad IMAC, en la que se utilizó la afinidad del *tag* de histidina con ciertos metales, como el Ni²⁺, para purificar la proteasa. La elución de la proteína que interacciona con la matriz se realizó mediante competencia por ligandos utilizando imidazol en el buffer de elución.

El seguimiento de cada etapa del proceso de purificación se hizo por SDS-PAGE 12%. Se puede observar (Fig. 12) que la proteína de fusión se cliva dentro mismo de la bacteria, lo que resulta en la obtención de MBP (aprox 45 kDa) y TEVp (aprox 29 kDa)

separadas y presentes, mayoritariamente, en la fracción soluble. También se observó que, luego de correr la fracción soluble por la columna, el lavado removió la mayoría de las proteínas contaminantes, incluida MBP, y que la fracción “Eluido” contiene en gran mayoría la TEVp con restos de contaminantes.

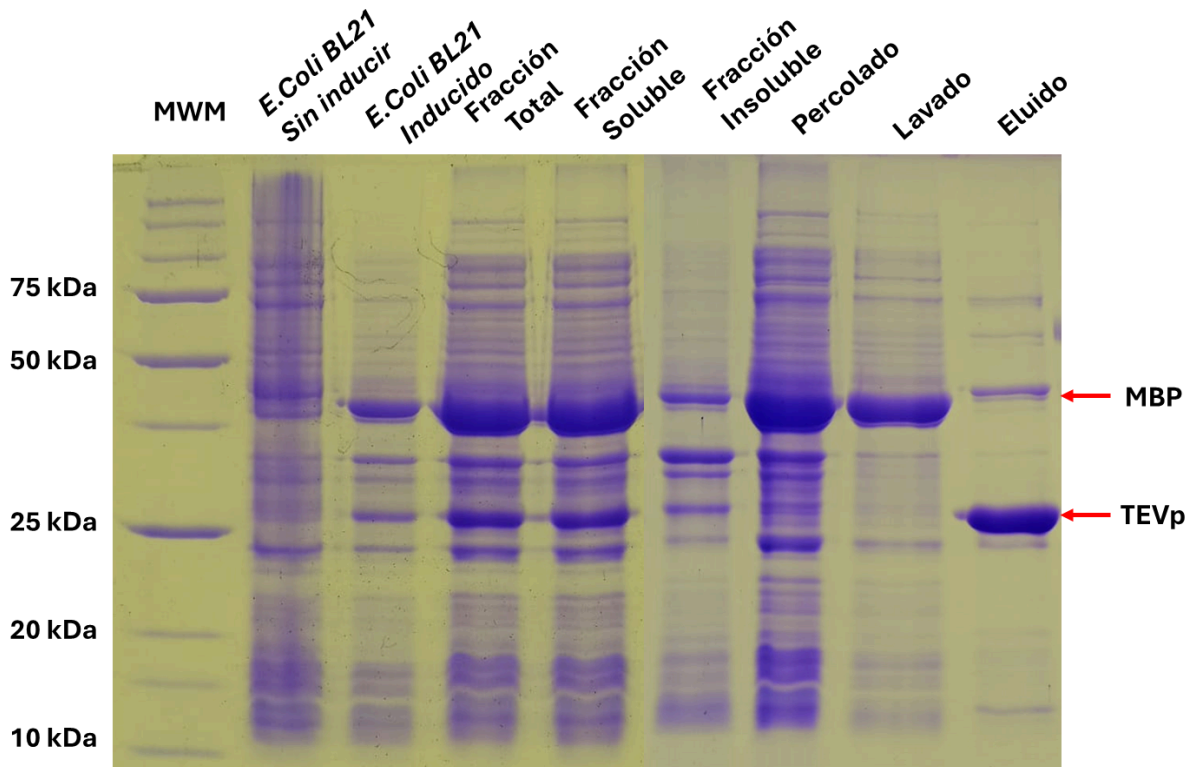


Figura 12: Seguimiento del proceso de purificación de His6-TEVp(S219V)-Arg5 por cromatografía de afinidad IMAC a través de SDS-PAGE 12%. El clivaje del constructo MBP-TEVp(S219V) ocurre *in vivo* (Inducido) y ambas proteínas están, en gran parte, solubilizadas (Fracción soluble). En la incubación, la mayoría de la proteasa TEVp es adsorbida por la columna (Percolado) y luego es recuperada con una gran pureza (Eluido).

MWM: Marcador de peso molecular.

La proteína obtenida del eluido de la purificación por IMAC se purificó posteriormente por cromatografía de exclusión molecular. Con el fin de eliminar agregados que pudieran afectar el libre flujo en la cromatografía, se centrifugó la muestra y se inyectó el sobrenadante en la columna. Previamente, se acondicionó la columna con dH₂O filtrada para

eliminar el etanol de guardado y, posteriormente, se equilibró con buffer de columna filtrado por una membrana de 0,45 μm .

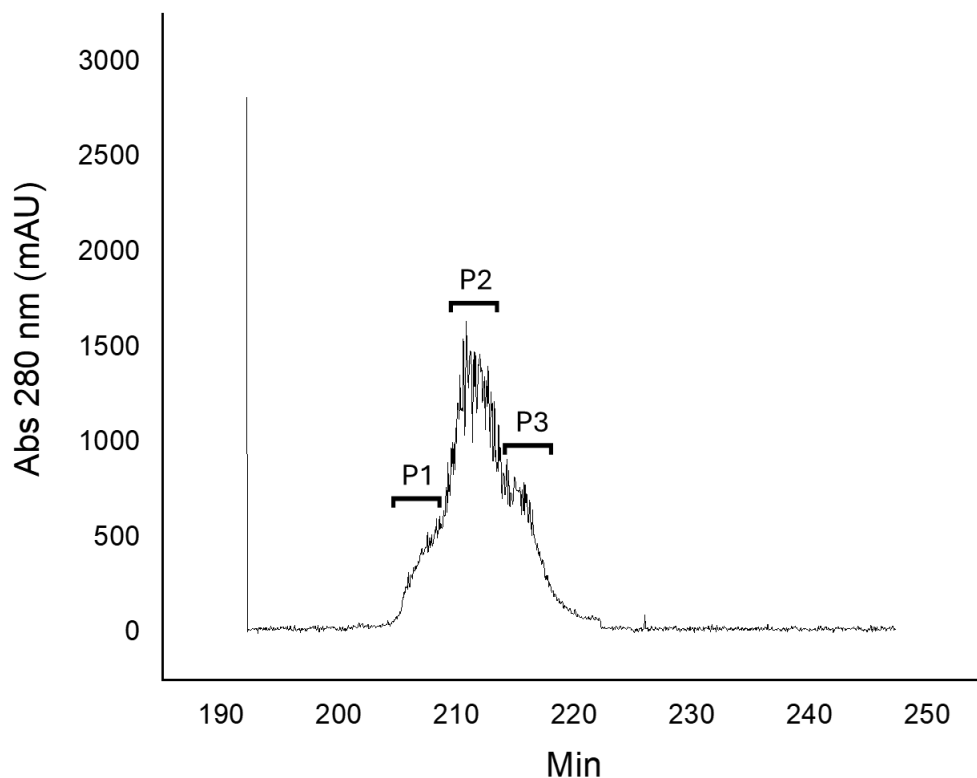


Figura 13: Cromatograma de la purificación de His6-TEVp(S219V)-Arg5 por cromatografía de exclusión molecular.

TABLA I: Fracciones recolectadas de la purificación con columna S200.

Fracciones	Inicio (min)	Fin (min)
Fracción 1	205,6	208,7
Fracción 2	208,7	215,3
Fracción 3	215,3	221,0

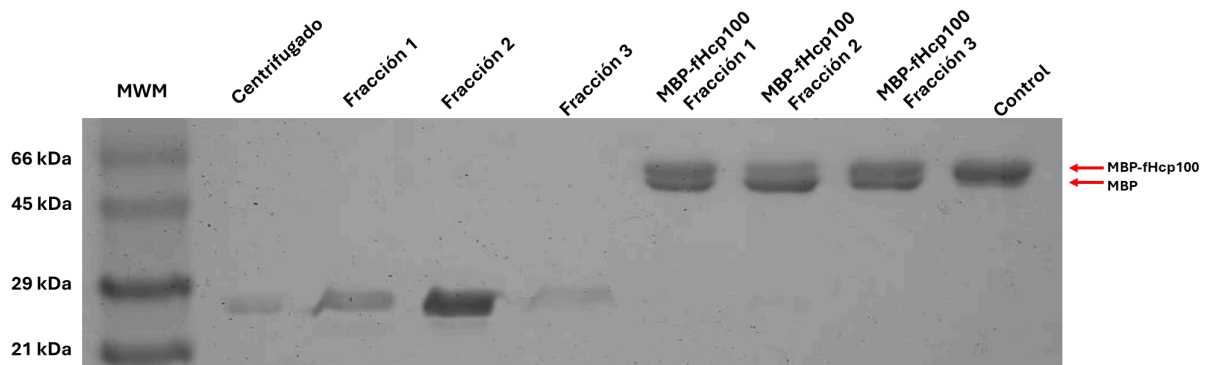


Figura 14: Seguimiento de la purificación de His6-TEVp(S219V)-Arg5 por cromatografía de exclusión molecular y su posterior ensayo de digestión a través de SDS-PAGE 12%. Luego de remover el agregado del eluido (Centrifugado), se recolectaron las distintas fracciones presentes en la muestra (Fracciones 1-3) y se realizó un ensayo de digestión con el sustrato MBP-fHcp100 para identificar la fracción con mayor actividad catalítica (MBP-fHcp100 Fracción 1-3).

Con el objetivo de identificar la fracción que contiene la proteasa correctamente plegada (Fig. 13), se procedió a evaluar la actividad proteolítica de las distintas fracciones eluidas de la columna S200 (ver Tabla I). Se observa (Fig.14) que una pequeña proporción del eluido precipitó, del sobrenadante se obtuvieron 3 fracciones con un peso molecular similar (aproximada 27 kDa), indicando la presencia de distintos plegamientos de la proteasa TEV. Con el fin de identificar la fracción con mayor actividad enzimática, se incubó, con MBP-fHcp100, las distintas fracciones, previamente cuantificadas, y se obtuvo una mayor banda de MBP-fHcp100 digerida con la segunda fracción obtenida de TEVp en comparación con el resto, aunque las otras fracciones también presentaron cierta actividad catalítica.

La cuantificación por método Bradford de la fracción 2 (Fig. 15) indicó una concentración de 0,66 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen de ~ 7 mL, obtenidos de una alícuota de 1 mL del eluido obtenido previamente ($\sim 10,2$ mL), dando una masa total de 47,12 mg (ver Tabla II) y un rendimiento de 23,56 mg/L de cultivo.

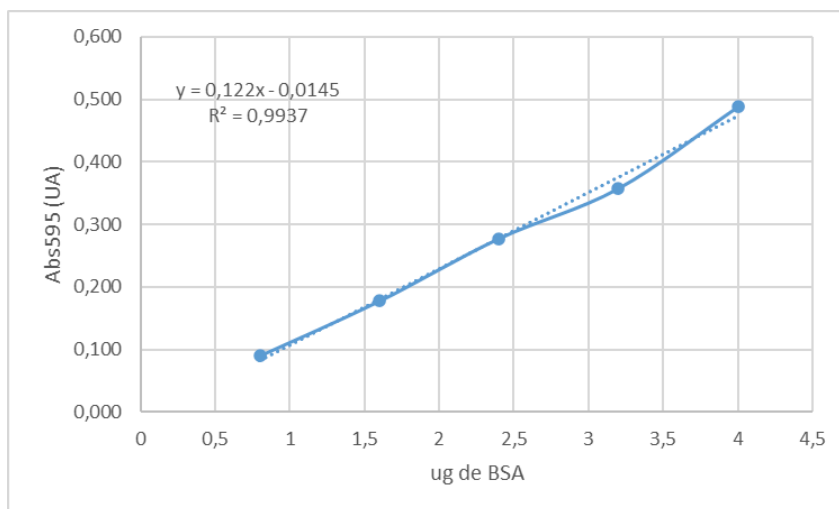


Figura 15: Curva estándar de BSA de la cuantificación por método Bradford.

TABLA II: Absorbancias de las muestras obtenidas de la cuantificación por método Bradford.

Muestra	Vol. (μL)	Factor de dilución	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio	Conc. (μg/μL)
Fracción 1	1	4	0,135	0,123	0,149	0,135	0,31
Fracción 2	1	4	0,309	0,306	0,312	0,309	0,66
Fracción 3	1	4	0,039	0,033	0,036	0,036	0,10

6.2. Expresión y purificación de la proteína MBP-fHcp100

Como sustrato de la TEVp se decidió utilizar la proteína MBP-fHcp100. Esta quimera, de aproximadamente 44 kDa, se la considera un blanco no complejo para la TEVp ya que es monomérica y el sitio de corte se encuentra expuesto al solvente. La expresión y el estado de MBP-fHcp100 fue analizado en las distintas etapas de la obtención y purificación. En este proceso se utilizó a la cepa BL21 DE3 de la bacteria *E.coli* con el plásmido pMAL-c5E el cual contiene el gen que codifica un fragmento de la proteína Hcp100 (fHcp100) unido a la proteína MBP a través de la secuencia de corte de la TEVp (Fig. 16).

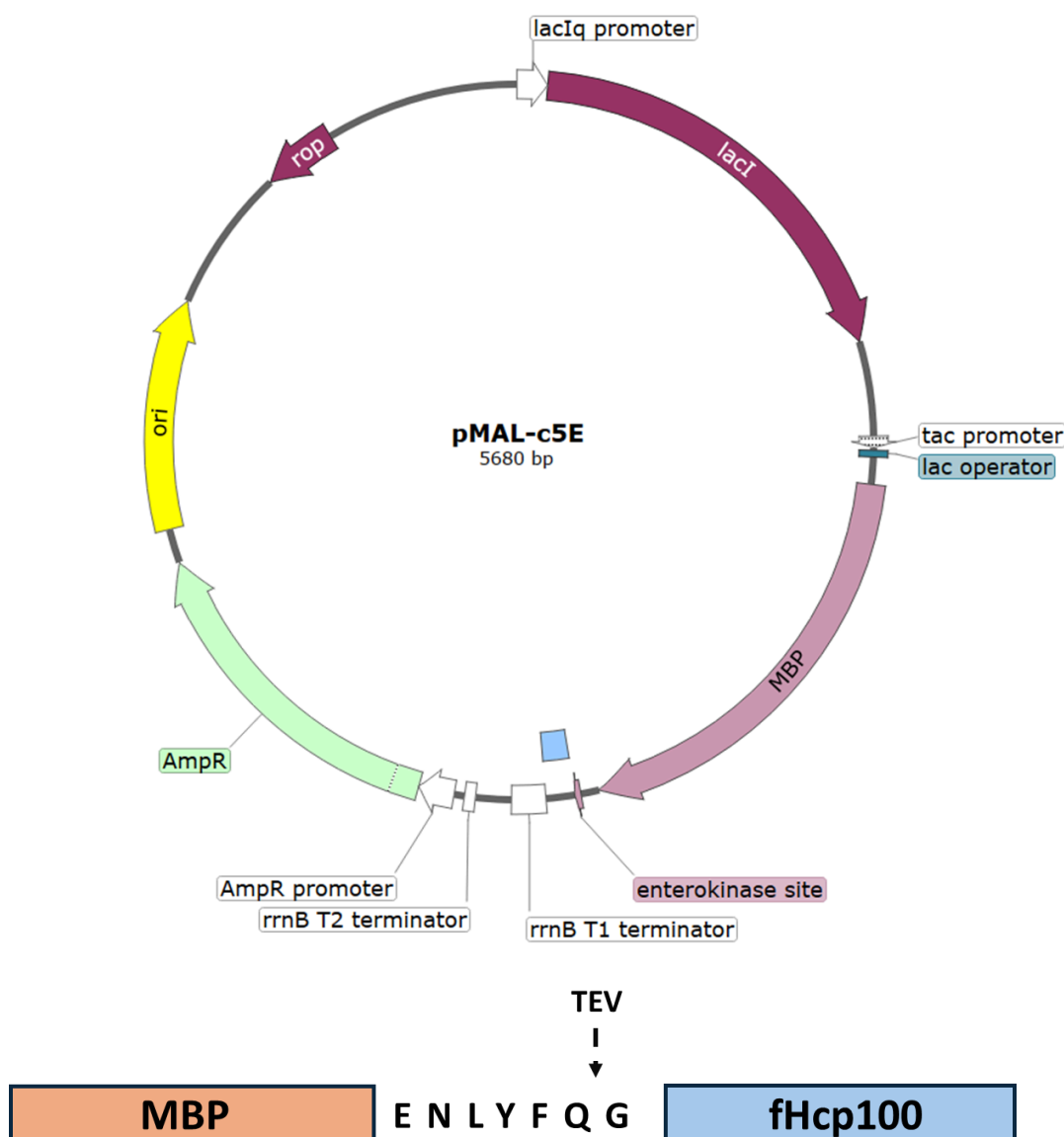


Figura 16: Diagrama del plásmido pMAL-c5E (Arriba) y del constructo del gen MBP-fHcp100 (Abajo) (Adaptado de Videla Garrido, 2022).

La purificación de la MBP-fHcp100 en la fracción soluble del lisado bacteriano se realizó mediante una cromatografía de afinidad con columna de amilosa, en la que se utilizó la afinidad de la proteína MBP por la amilosa. La elución de la proteína que interacciona con la matriz se realiza mediante competencia por ligandos utilizando maltosa en el buffer de elución.

El seguimiento de cada etapa del proceso de purificación se realizó por SDS-PAGE 12%. Se puede observar (Fig. 17) que la proteína está presente tanto en la fracción soluble como en la insoluble y que la fracción “Eluido” contiene a la MBP-fHcp100 en gran proporción. Como el constructo se obtuvo con una gran pureza en un solo paso de purificación, se decidió utilizarlo en los ensayos con TEVp.

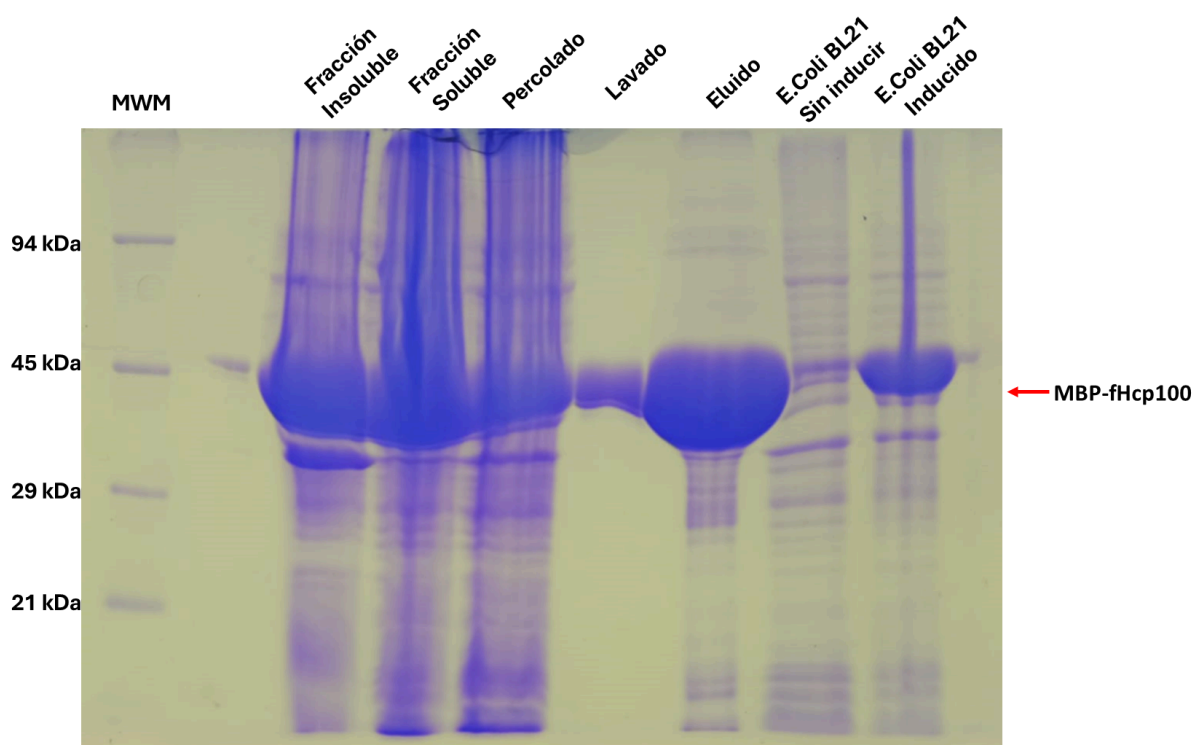


Figura 17: Seguimiento del proceso de purificación de MBP-fHcp100 por cromatografía de afinidad con columna de amilosa a través de SDS-PAGE 12%. La proteína del constructo está presente tanto en la fracción soluble como insoluble (Fracción Soluble y Fracción Soluble).

En la incubación, se saturó la columna (Percolado) y parte de la proteína se perdió en los lavados (Lavado), aunque se obtuvo un eluido con una alta pureza (Eluido). MWM: Marcador de peso molecular.

La cuantificación por método Bradford de la fracción eluido (Fig. 18) indicó una concentración de 3,72 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen de ~ 28 mL, dando una masa total de 104,16 mg de MBP-fHcp100 y un rendimiento de 104,16 mg/L de medio de cultivo (ver Tabla III).

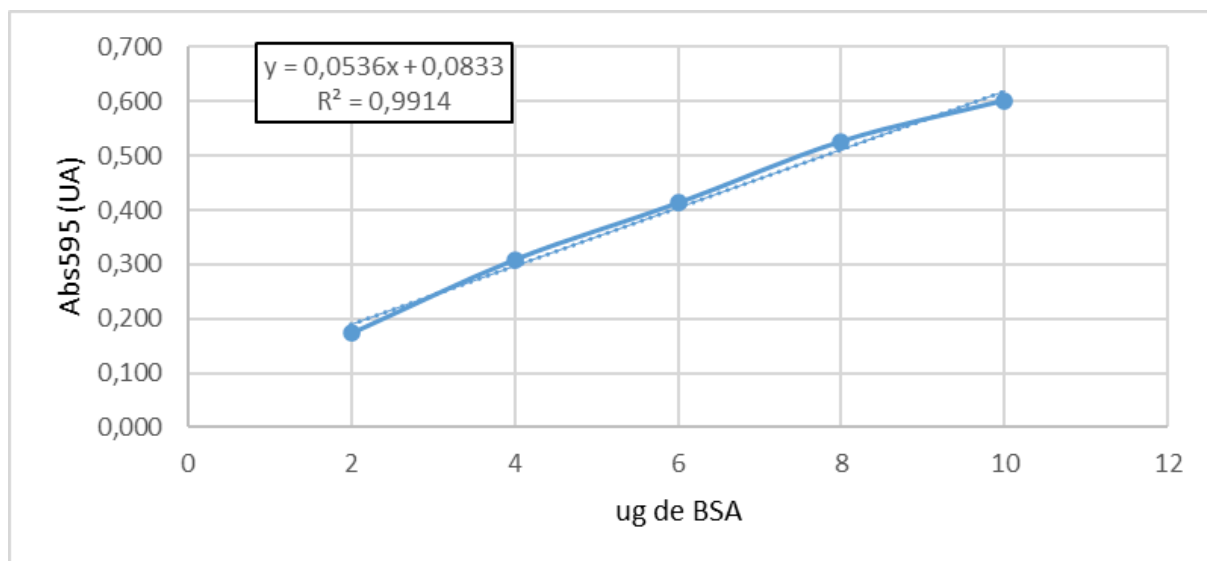


Figura 18: Curva estándar de BSA de la cuantificación por método Bradford.

TABLA III: Absorbancias de las muestras obtenidas de la cuantificación por método Bradford.

Muestra	Vol. (μL)	Factor dilución	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio	Conc. (μg/μL)
Fracción Eluido	10	10	0,270	0,282	0,296	0,283	3,72

6.3. Puesta a punto de la digestión de MBP-fHcp100 con TEVp

La optimización del corte de MBP-fHcp100 con TEVp se definió en función de la relación TEVp:MBP-fHcp100 (relación enzima/sustrato expresada en m/m), la temperatura de corte y el tiempo de incubación. En primer lugar, se estableció la relación óptima de enzima/sustrato y para ello se incubaron ambas proteínas en distintas relaciones masa/masa a 4 y 20 h.

Alternativamente se determinó si la TEVp purificada solo por la columna IMAC (primer paso) y la TEVp purificada por IMAC + SEC (segundo paso) mostraban diferencias en la actividad proteolítica.

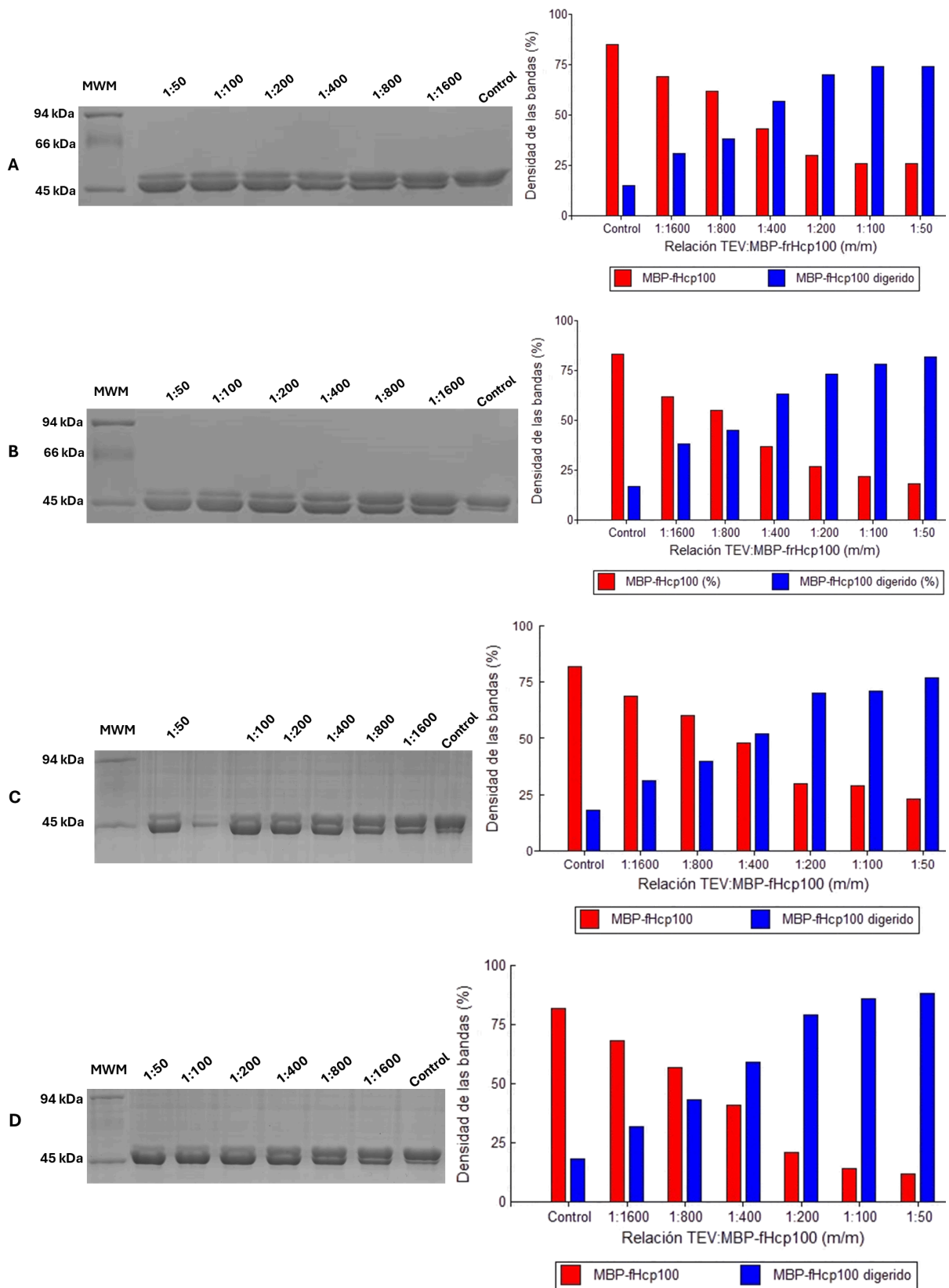


Figura 19: Análisis de la digestión utilizando distintas relaciones de TEV:MBP-fHcp100 (m/m) a través de SDS-PAGE 12% (Izquierda). Se usó TEVp purificada con un solo paso de purificación (IMAC) a 4 h (A) y 20 h (B), y con dos pasos de purificación (IMAC + SEC) a 4 h (C) y 20 h (D) para analizar la actividad proteolítica al comparar los porcentajes de corte (Derecha).

Como se indicó en la Sección 5.9, el porcentaje de corte se determinó mediante la cuantificación de la intensidad de la banda de MBP-fHcp100 digerida (la proteína MBP sola) en relación a todas las bandas de la muestra sembrada (MBP + MBP-fHcp100) reveladas en el gel SDS-PAGE (el fragmento de Hcp100 no se tomó en consideración debido a que no se puede ver su banda en el gel y su porcentaje de composición de la quimera es bajo).

La relación óptima la definimos como aquella relación enzima/sustrato en donde se obtiene un 70% de fracción digerida utilizando la menor cantidad de proteasa. Como se observa (Fig. 19), las relaciones 1:50, 1:100 y 1:200 permitieron obtener un porcentaje de digestión igual o mayor al establecido como óptimo, por lo cual se definió a esta última (relación 1:200 TEVp:MBP-fHcp100 (m/m)) como la relación óptima. También se observó que la TEVp con un paso de purificación tuvo la misma actividad enzimática que la obtenida con dos pasos de purificación ya que se obtuvieron porcentajes de cortes similares tanto a las 4 hs como a las 20 hs.

Además de la relación óptima, también se observó que se alcanzó el porcentaje de digestión propuesto para la relación óptima a las 4 hs y que el porcentaje de blanco digerido no variaba de forma significativa entre las muestras de 4 y 20 hs, por lo que se decidió definir como tiempo de digestión óptimo a las 4 hs.

Luego de definir la relación y el tiempo de digestión óptimo, se incubó MBP-fHcp100 con TEVp y se tomaron distintas muestras a lo largo de la incubación de 4 h para obtener la cinética de digestión frente a este blanco.

Se obtuvo la densidad de las bandas del blanco digerido de los distintos puntos dentro de las 4 hs de corte (Figura 20) y con estos datos se aproximó el tiempo de incubación necesario para digerir el 50 % de MBP-fHcp100 con el fin de utilizarlo en el resto de los ensayos para comparar el efecto de los excipientes en la proteasa. Se obtuvo una ecuación

lineal al graficar los datos invertidos de tiempo y porcentaje de banda, con la cual se obtuvo un tiempo de incubación de 34 minutos.

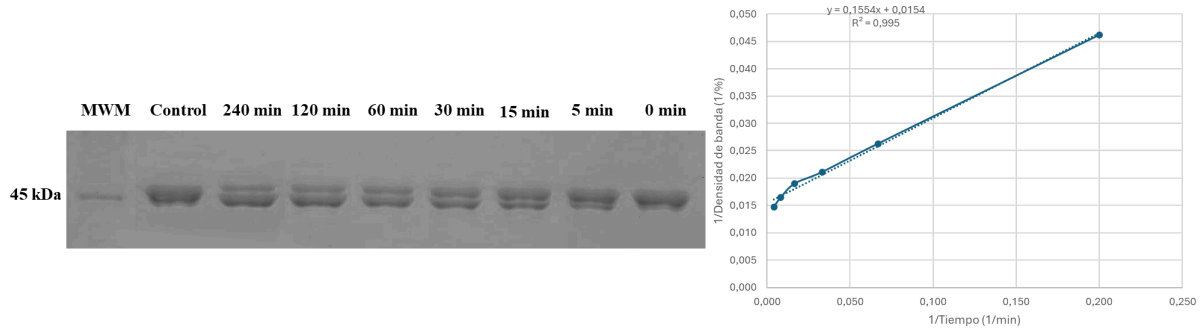
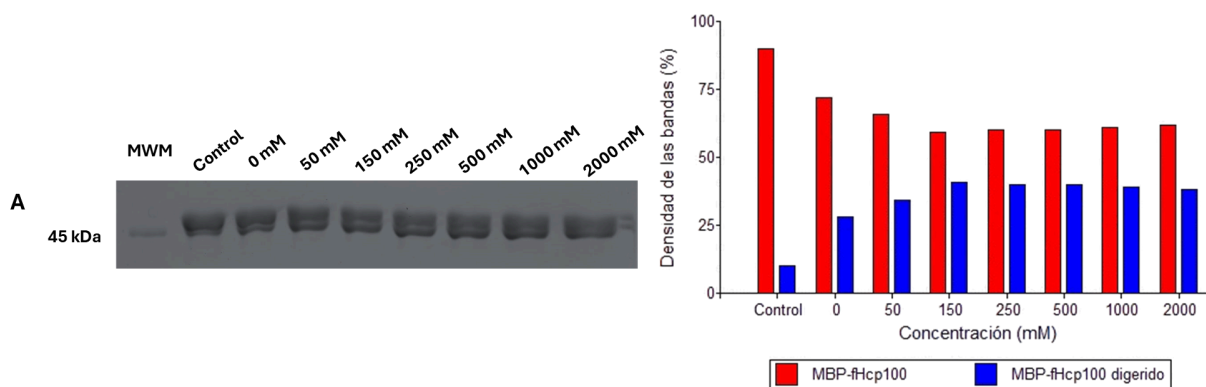
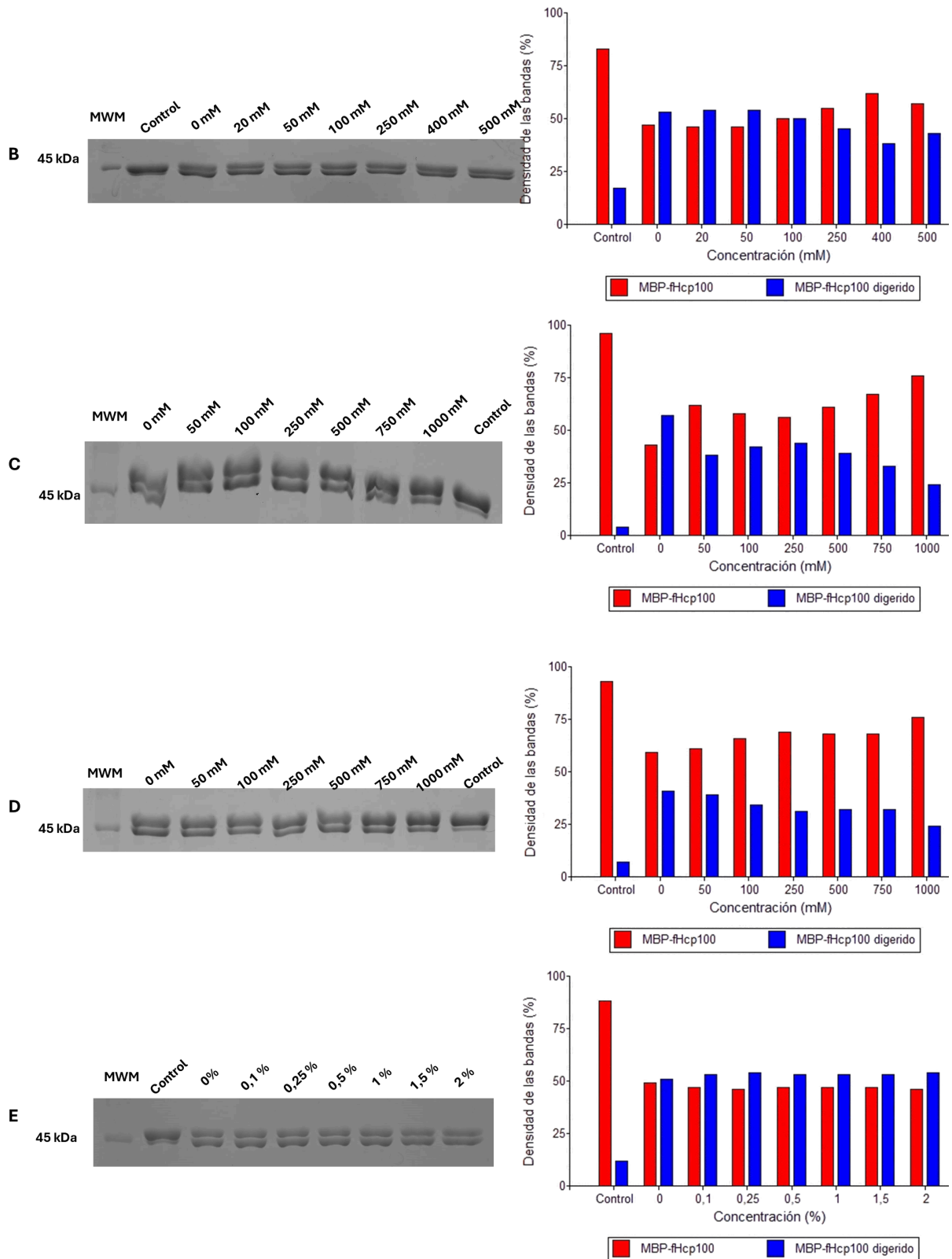


Figura 20: Análisis de la cinética de digestión frente a MBP-fHcp100 a través de SDS-PAGE 10 % (Izquierda). La densidad de las bandas se utilizó para medir el porcentaje de digestión en los distintos puntos de incubación y con ellos obtener un gráfico de la misma cinética (derecha).

6.4. Digestión de MBP-fHcp100 con distintos excipientes

Luego de la puesta a punto del corte de MBP-fHcp100 con TEVp, se analizó el efecto de la presencia de excipientes de diferentes naturalezas en la cinética de corte de la proteasa. La curva de cinética enzimática permitió concluir que a los 34 minutos de la reacción se clivó el 50% de MBP-fHcp100, por lo que se usó este tiempo incubación para analizar el efecto de los excipientes en la cinética de la proteasa.





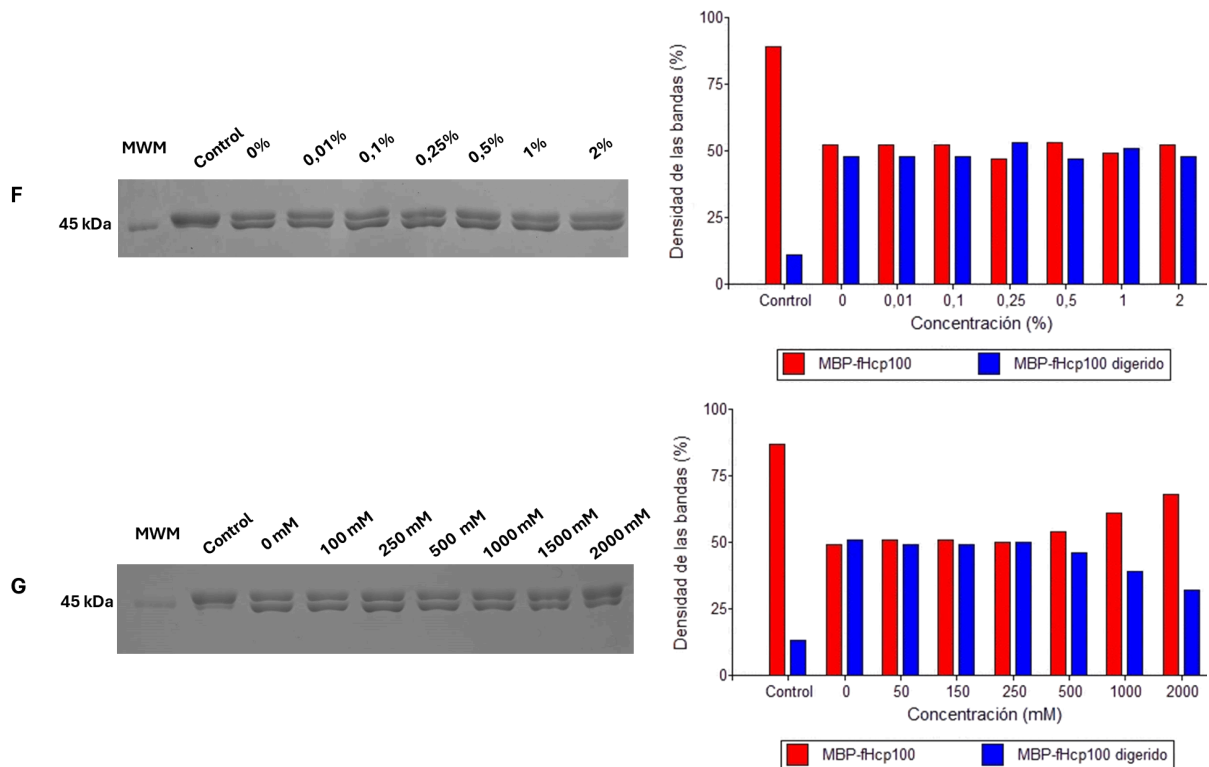


Figura 21: Análisis del efecto de la presencia de diferentes excipientes en la cinética enzimática de TEVp a través de SDS-PAGE 10% (Izquierda). Se utilizaron distintas concentraciones de NaCl (A), arginina (B), sacarosa (C), trehalosa (D), tritón X-100 (E), tween 20 (F) y urea (G), y se analizó su efecto al cuantificar las bandas para obtener los porcentajes de corte (Derecha).

Analizando la densidad de las bandas (Fig. 21), se obtuvo una alta variación de actividad enzimática de TEVp dependiente del excipiente y de su concentración. La presencia de NaCl en concentraciones entre 50 y 150 mM mejora la actividad de la proteasa y esta mantiene su cinética incluso en concentraciones hasta 2 M. En presencia de la arginina, la TEVp no sufrió cambios en la cinética con concentraciones hasta los 100 mM y luego empieza a disminuir con mayores concentraciones, lo mismo ocurre en el caso de la urea (hasta 250 mM) y trehalosa (50 mM). La presencia de tween 20 y tritón X-100 no modificó la actividad de la enzima en las concentraciones probadas. En el caso de la sacarosa, la actividad de la enzima se vio disminuída desde la menor concentración utilizada (50 mM).

6.5. Expresión y purificación de la proteína MBP-CCNA2(Δ 171)

Como sustrato complejo de la TEVp se decidió utilizar la proteína MBP-CCNA2(Δ 171), este constructo, de aproximadamente 75 kDa, tiene una estructura que tiende a oligomerizarse, por lo que la secuencia de reconocimiento de la proteasa TEV no se expone completamente, lo que lo hace un buen sustrato “complejo”. La expresión y el estado de la MBP-CCNA2(Δ 171) fue analizado en las distintas etapas de la obtención y purificación. En este proceso se utilizó la cepa C41 de la bacteria *E.coli* con el plásmido pMAL-c5X, el cual contiene el gen de la Ciclina A2 Humana (CCNA2), con una delección del aminoácido 171, unido a proteína MBP a través de la secuencia de corte de TEVp. Además, la misma contiene un tag de 6 histidinas en el N-terminal posterior a la secuencia de corte (Fig. 22).

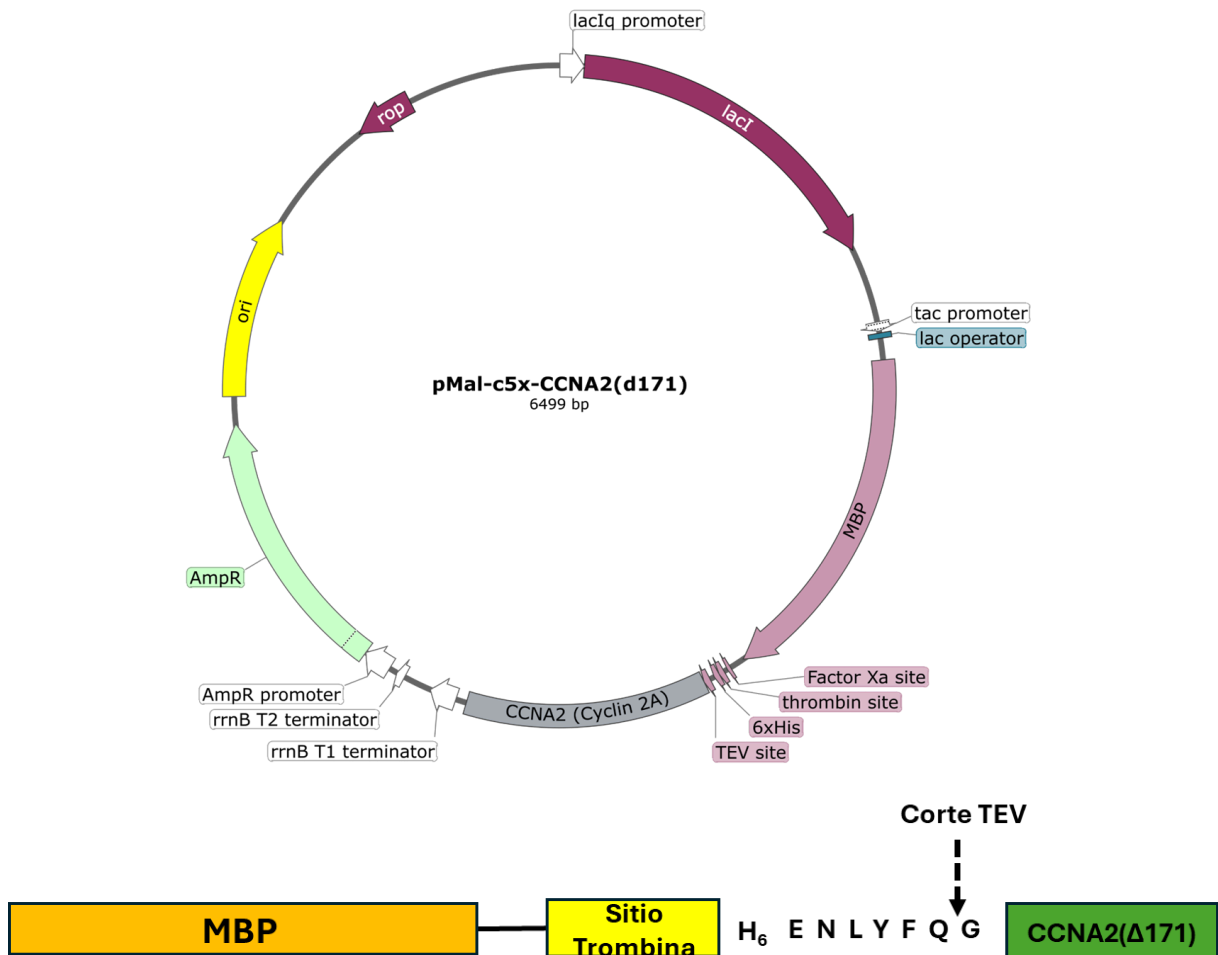


Figura 22: Diagrama del plásmido pMAL-c5X-CCNA2(Δ 171) (Arriba) y del constructo del gen MBP-Tbn-His6-TEV-CCNA2(Δ 171) (Abajo).

La purificación de la MBP-CCNA2(Δ 171) en la fracción soluble del lisado bacteriano se realizó por cromatografía de afinidad con columna de amilosa, cuyo funcionamiento se explicó en la Sección 6.2.

El seguimiento de cada etapa del proceso de purificación se hizo por SDS-PAGE 12%. Se puede observar (Fig. 23) que la proteína está presente mayoritariamente en la fracción soluble en comparación con la insoluble y que la fracción eluido contiene a la MBP-CCNA2(Δ 171) en gran proporción.

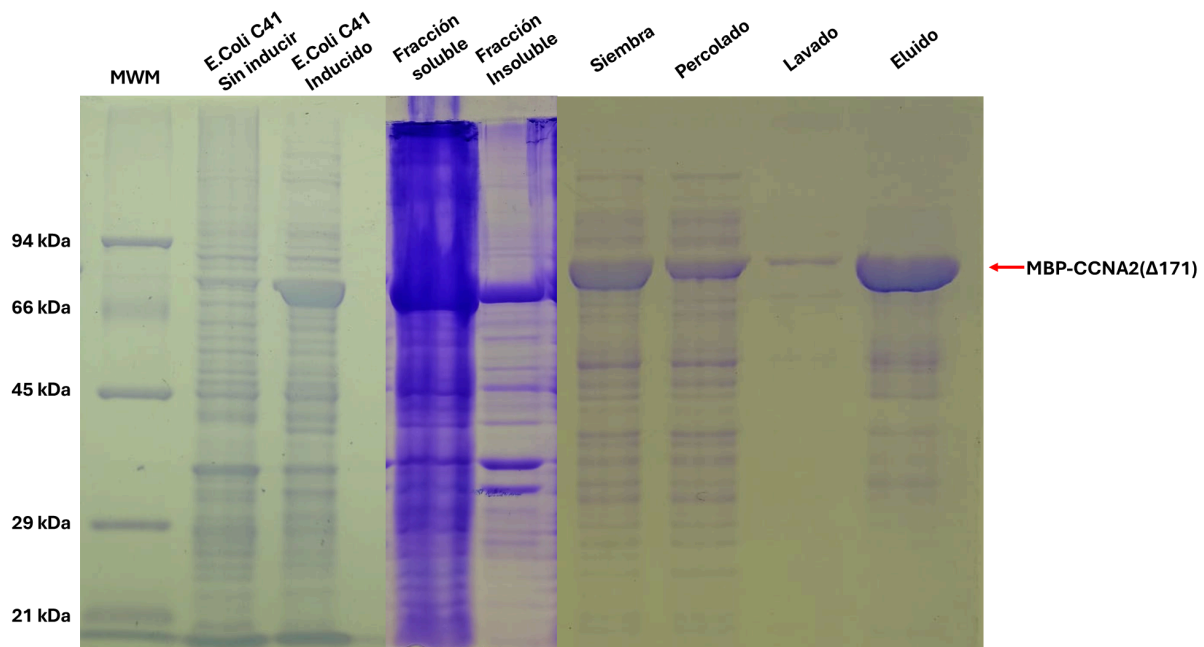


Figura 23: Seguimiento del proceso de purificación de MBP-CCNA2(Δ 171) por cromatografía de afinidad con columna de amilosa a través de SDS-PAGE 12%. La quimera se encuentra en gran parte en la fracción soluble (Fracción Soluble y Fracción Insoluble). En la incubación, la columna se saturó (Percolado) y hubo una pérdida mínima en el lavado (Lavado), aún así se pudo obtener un eluido con una alta pureza (Eluido). MWM: Marcador de peso molecular.

La proteína obtenida del eluido de la purificación por columna de amilosa se purificó posteriormente por cromatografía de exclusión molecular. Previo a esto, el eluido se concentró utilizando un centricon (JetBioFil) con un *cut off* de 30 kDa a 3800 g, 4°C y se le

agregó DTT a una concentración final de 1 mM. La alícuota a purificar se centrifugó y se inyectó el sobrenadante en la columna. Previamente, se acondicionó la columna con dH₂O filtrada para eliminar el etanol de guardado y, posteriormente, se equilibró con buffer de columna filtrado por una membrana de 0,45 µm.

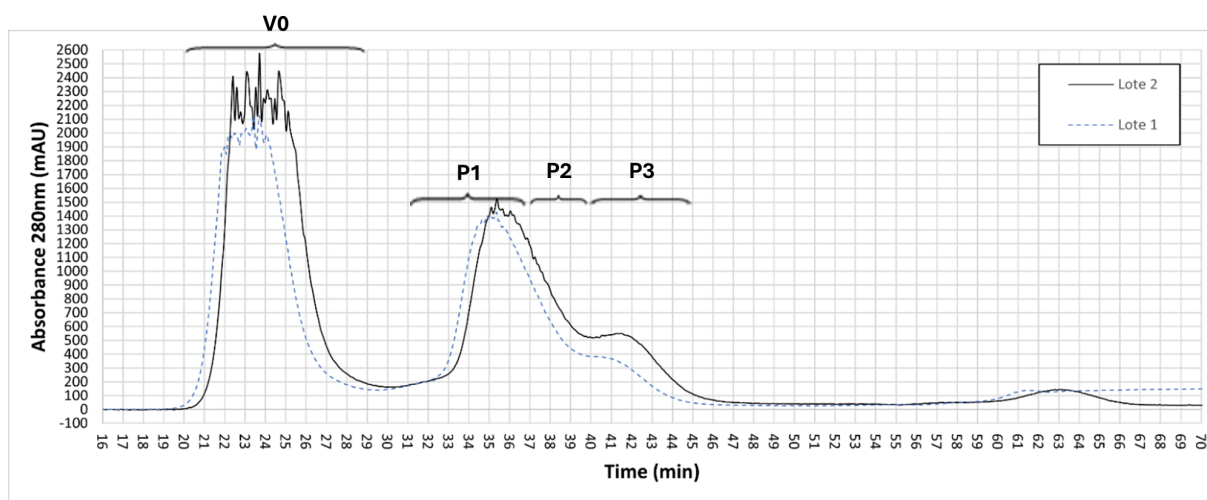


Figura 24: Cromatograma de la purificación de MBP-CCNA2(Δ 171) por cromatografía de exclusión molecular.

TABLA IV: Fracciones recolectadas de la purificación con columna S200.

Fracciones	Inicio (min)	Fin (min)
Fracción V0	20,33	29,25
Fracción P1	31,57	37,85
Fracción P2	37,85	40,39
Fracción P3	40,39	46,55

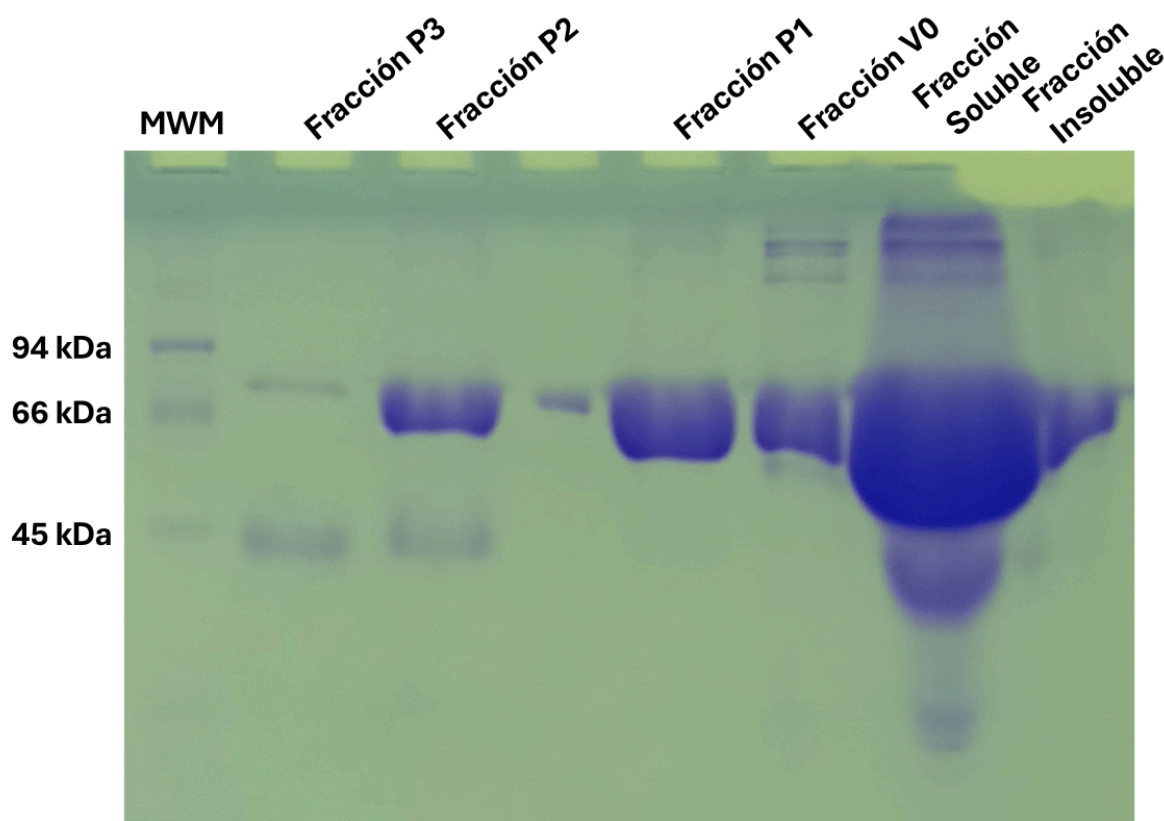


Figura 25: Seguimiento de la purificación de MBP-CCNA2(Δ 171) por cromatografía de exclusión molecular. Luego de remover el agregado del eluido (Fracción insoluble y Fracción insoluble) y se recolectaron las distintas fracciones presentes en la muestra (Fracción V0, P1, P2 y P3) para identificar la fracción que contiene el constructo oligomerizado. MWM: Marcador de peso molecular.

Con el objetivo de obtener la fracción oligomerizada de la quimera, se recolectaron las distintas fracciones presentes en la muestra del eluido (ver TABLA IV). De las diferentes fracciones obtenidas, se optó por utilizar la fracción V0 debido a que esta contiene especies de alto peso molecular debido a su oligomerización, y por eso mismo no son retenidas por la columna (siendo eluidas en la primera fracción en salir) (Fig. 24). Se observa (Fig. 25) que una pequeña parte del eluido precipitó, de las 4 fracciones obtenidas la V0 contiene en su mayoría a MBP-CCNA2(Δ 171) (banda de 75 kDa), aunque también están presentes otros contaminantes en menor medida; la fracción P1 contiene al constructo en su forma monomérica pura, y la fracción P3 está contaminada en su gran mayoría con la proteína MBP debido a la presencia de una banda de aproximadamente 45 kDa.

La cuantificación por método Bradford de la fracción V0 (Fig. 26) indicó una concentración de 0,701 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ en un volumen de ~ 9 mL, dando una masa total de 6,31 mg de MBP-CCNA2(Δ 171) y un rendimiento de 3,16 mg/L de medio de cultivo (ver Tabla V). Esta fracción V0 se guardó a -80°C para ser utilizada en los siguientes ensayos como blanco “complejo”.

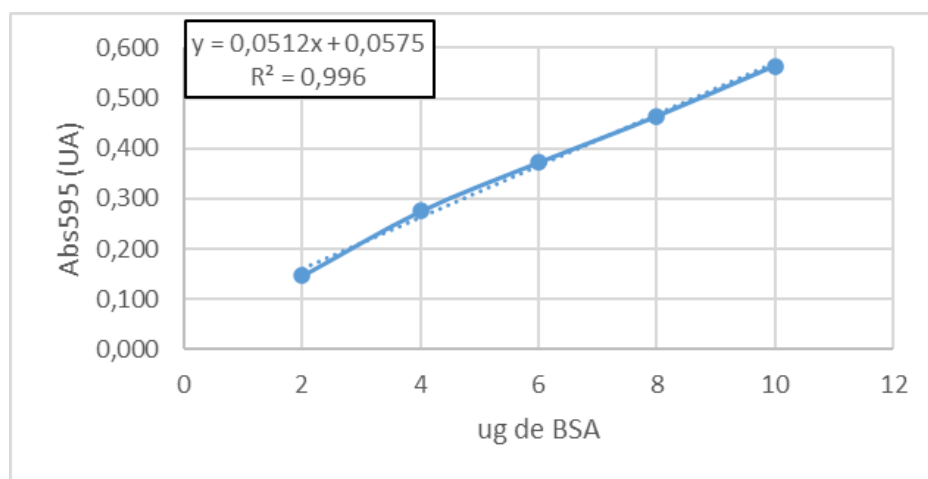


Figura 26: Curva estándar de BSA de la cuantificación por método Bradford.

TABLA V: Absorbancias de la muestra obtenida de la cuantificación por método Bradford.

Muestra	Vol (μL)	Factor de dilución	Abs 1	Abs 2	Abs 3	Abs promedio	Conc ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
Fracción V0	10	1	0,416	0,421	0,412	0,416	0,701

6.6. Puesta a punto de la digestión de MBP-CCNA2(Δ 171) con TEVp

La optimización del corte de MBP-CCNA2(Δ 171) con TEVp se definió en función de la relación TEVp:MBP-CCNA2(Δ 171) (relación enzima/sustrato expresada en m/m) y el tiempo de incubación. En primer lugar, se estableció la relación óptima de enzima/sustrato y para ello se incubaron ambas proteínas en distintas relaciones masa/masa.

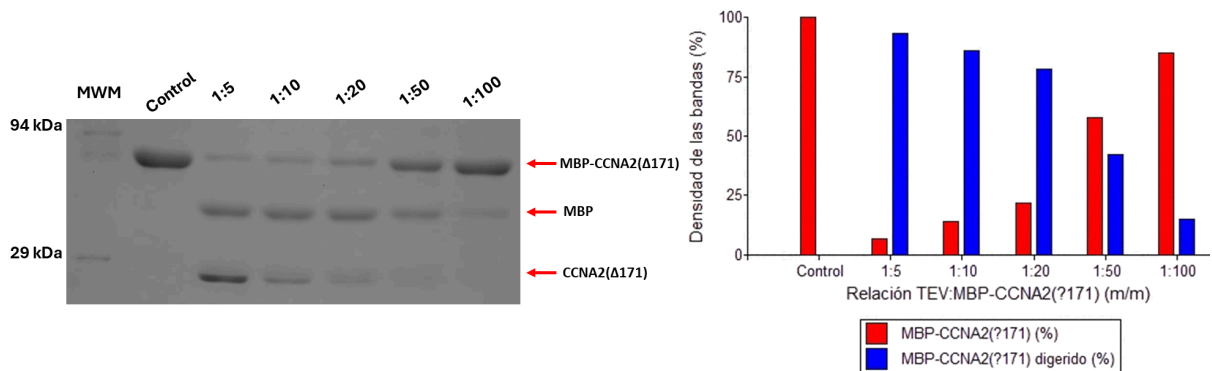


Figura 27: Análisis de la digestión utilizando distintas relaciones de TEV: MBP-CCNA2(Δ 171) (m/m) a través de SDS-PAGE 12% (Izquierda). La densidad de las bandas fueron cuantificadas para obtener el porcentaje de corte de cada condición (Derecha).

El criterio a utilizar para definir la relación óptima fue el mismo utilizado en la puesta a punto de la relación TEV:MBP-fHcp100 (m/m) (Sección 6.3). Como se puede observar (Fig. 27), las relaciones 1:5, 1:10 y 1:20 permitieron obtener un porcentaje de digestión igual o mayor al establecido como óptimo, por lo cual se definió a esta última (relación 1:20 TEVp:MBP-CCNA2(Δ 171) (m/m)) como la relación óptima. Además, se observó que se alcanzó el porcentaje de digestión propuesto para la relación óptima a las 4 h, por lo que se utilizó a este como tiempo de digestión.

Luego de definir la relación, se incubó MBP-CCNA2(Δ 171) con TEVp y se tomaron distintas muestras a lo largo de la incubación de 4 h para obtener la cinética de digestión frente a este blanco.

Se obtuvo la densidad de las bandas del blanco digerido de los distintos puntos dentro de las 4 hs de corte (Figura 28) y con estos datos se aproximó el tiempo de incubación necesario para digerir el 50 % de MBP-CCNA2(Δ 171) con el fin de utilizarlo en el resto de los ensayos para comparar el efecto de los excipientes en la proteasa. Los datos obtenidos se los trató de la misma forma que en la sección 6.3 y se obtuvo que el tiempo aproximado para llegar al 50 % de digestión es a los 56 minutos.

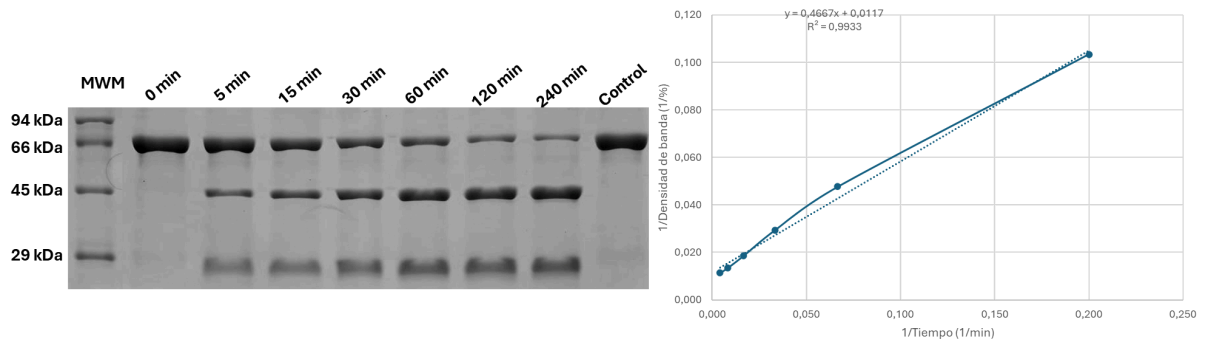
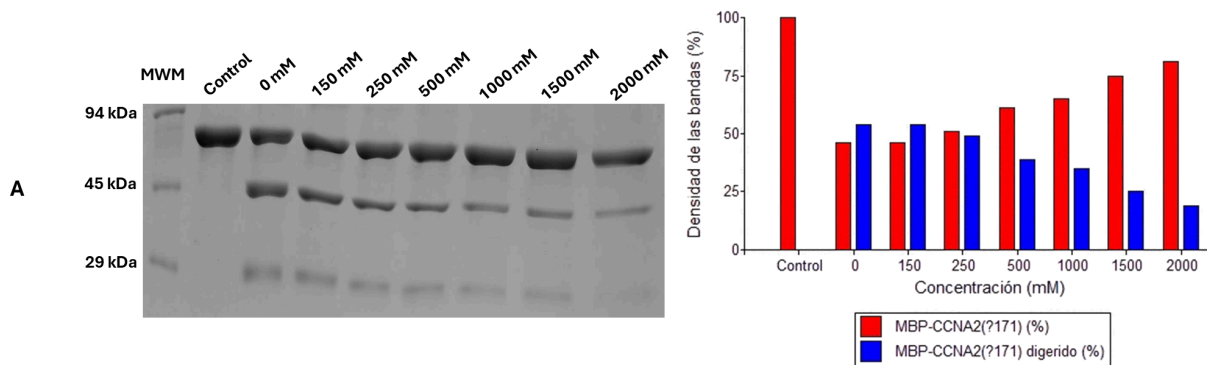
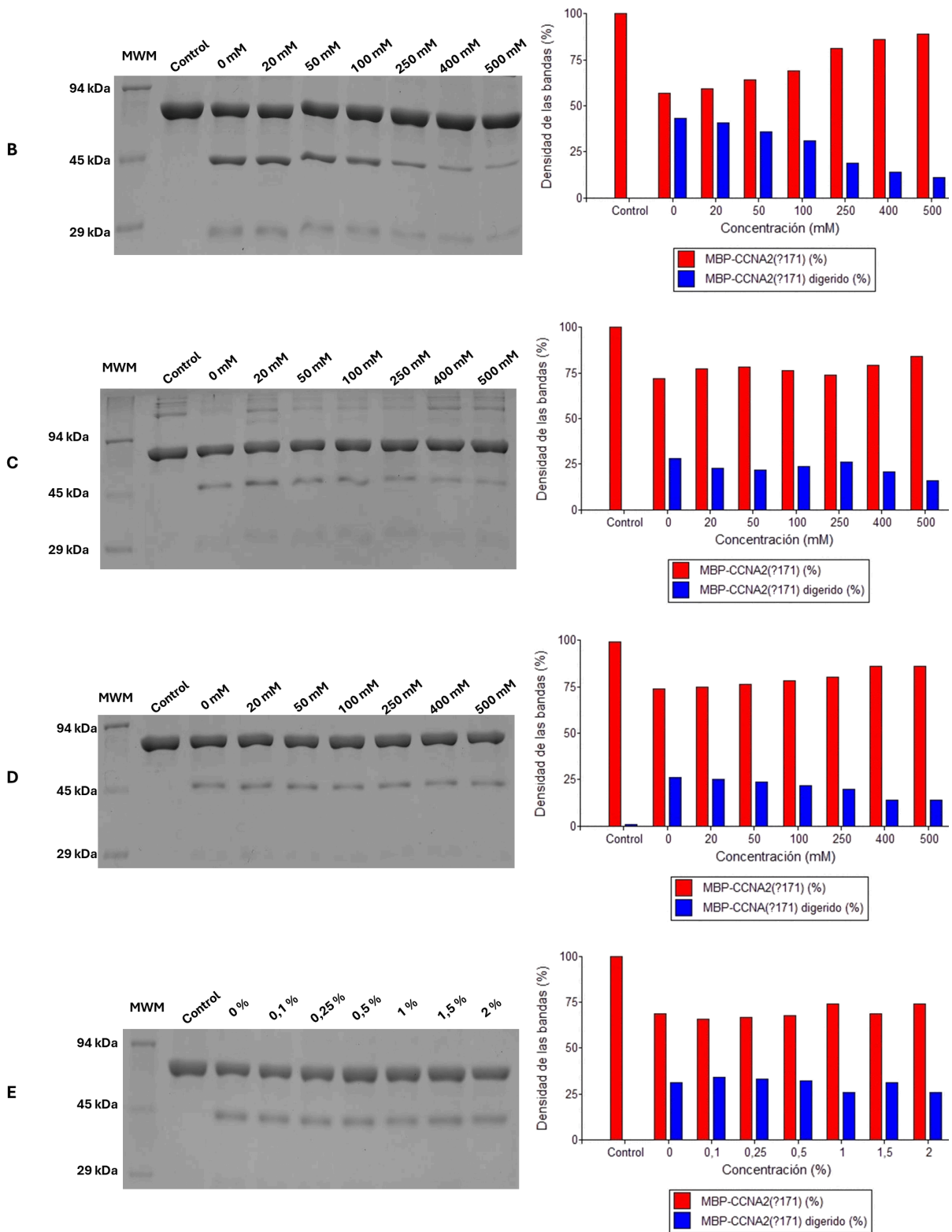


Figura 28: Análisis de la cinética de digestión frente a MBP-CCNA2(Δ 171) a través de SDS-PAGE 12 % (Izquierda). La densidad de las bandas se utilizó para medir el porcentaje de digestión en los distintos puntos de incubación y con ellos obtener un gráfico de la misma cinética (derecha).

6.7. Digestión de MBP-CCNA2(Δ 171) con distintos excipientes

Luego de la puesta a punto del corte de MBP-CCNA2(Δ 171) con TEVp se analizó el efecto de la presencia de excipientes de diferentes naturalezas en la cinética de corte de la proteasa frente a un blanco “complejo”. Para esto se utilizó ambas proteínas, utilizando una relación 1:20 (TEVp:MBP-CCNA2(Δ 171)), se les agregó buffer de digestión con distintas concentraciones de diferentes excipientes y se las incubó a 30°C durante 56 minutos.





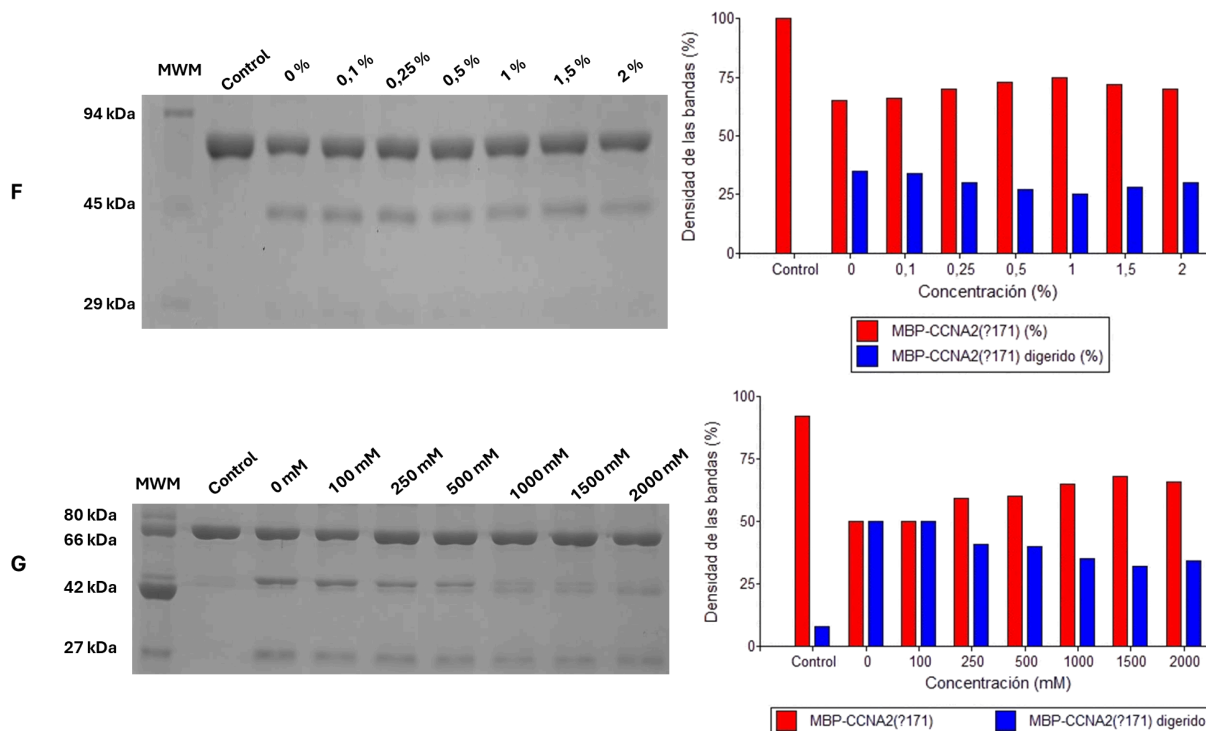


Figura 29: Análisis del efecto de la presencia de diferentes excipientes en la cinética enzimática de TEVp a través de SDS-PAGE 12% (Izquierda). Se utilizaron distintas concentraciones de NaCl (A), arginina (B), sacarosa (C), trehalosa (D), tritón X-100 (E), tween 20 (F) y urea (G) y se analizó su efecto al cuantificar las bandas para obtener los porcentajes de corte (Derecha).

Analizando la densidad de las bandas (Fig. 29), se obtuvo una alta variación de actividad enzimática de TEVp dependiente del excipiente, aunque en general no mejoró la actividad enzimática frente a un blanco “complejo”. La presencia de NaCl no afecta la actividad de la proteasa hasta concentraciones de 250 mM y luego disminuye de forma gradual, también ocurre lo mismo con arginina, hasta concentraciones de 20 mM; sacarosa, hasta concentraciones de 400 mM; trehalosa, hasta concentraciones de 250 mM; y urea, hasta concentraciones de 100 mM. En presencia de la trehalosa, tritón X-100 y tween 20, la TEVp no sufrió cambios en su cinética dentro de las concentraciones utilizadas.

7. Discusión

El proceso utilizado para la obtención de TEVp (Figura 10) se basó en el trabajo publicado por el grupo de Tropea y col. (Tropea et al., 2009), aunque se modificaron ciertas partes del proceso. En el protocolo original se utilizó la cepa BL21 (DE3) CodonPlus-RIL, esta cepa expresa una mayor cantidad de tRNAs de codones pocos usados en E.coli (presentes en la secuencia de TEVp), por lo que puede superar este sesgo de codones y aumentar la cantidad de proteína obtenida (Kleber-Janke & Becker, 2000). Aunque no se menciona el rendimiento por litro de cultivo, sí se menciona que la expresión de la proteasa mejora. En (Lucast et al., 2001; Parks et al., 1995) se indican rendimientos de 10 y 1,4 mg por litro de cultivo utilizando la misma cepa, aunque en el primer ejemplo se obtiene TEVp en cuerpos de inclusión y luego se renaturaliza, y en el segundo ejemplo se obtiene TEVp soluble sin estar en una proteína de fusión, por lo que el rendimiento obtenido en este trabajo, aún utilizando la misma cepa, se podría deber a la unión de la proteasa al extremo C-terminal de MBP (ver Tabla II).

Se utilizó el constructo MBP-fHcp100, como sustrato de referencia, ya que presenta un sitio de corte expuesto debido a que se trata de un péptido pequeño de 34 aminoácidos que no posee estructura terciaria consolidada. El proceso de purificación permitió la obtención de un producto homogéneo y monomérico. Esto se vio reflejado en la puesta a punto de la digestión de la quimera, en la cual una relación proteína/sustrato 1:200 TEVp:MBP-fHcp100 (m/m) obtuvo una digestión igual o mayor al 70 % luego de 4 horas de incubación a 30 °C, como indica la bibliografía (Nallamsetty et al., 2004). Durante estos ensayos también se comparó la actividad entre un lotes con uno o dos etapas de purificación (por IMAC o IMAC + SEC) y se obtuvo que no había diferencia significativa entre los dos lotes, esto se puede deber a que luego de purificar la muestra por SEC, parte de esta estaba plegada en un estado inactivo, y, al agregar el buffer de digestión antes de largar el ensayo, esto pudo haber replegado en su forma activa. También, el tiempo implementado en el ensayo de ambos lotes permitió llegar a un estado de equilibrio entre la enzima libre y el complejo enzima-sustrato, disminuyendo su actividad catalítica a medida que avanzaba la reacción, lo que llevaría a obtener un porcentaje similar de sustrato digerido (o producto obtenido).

En cambio, el constructo MBP-CCNA2 presenta un sitio de corte menos expuesto debido a que CCNA2(Δ 171) tiende a oligomerizar y formar especies de alto peso molecular. Estos oligómeros se observan en una columna de exclusión molecular (Figura 24) como especies que eluyen antes que la especie monomérica. Nuestro proceso de purificación permitió la obtención de la variante oligomerizada de la quimera la cual es un sustrato ideal para el estudio del efecto del impedimento estérico sobre la eficacia de corte de una TEV altamente purificada. Este efecto se vio reflejado en un aumento de la relación enzima/sustrato 10 veces mayor en comparación con MBP-fHcp100 para lograr el mismo nivel de corte.

En otras ocasiones se ha estudiado el uso de excipientes para mejorar la obtención y/o estabilización del producto obtenido a partir de una proteína de fusión. Aunque se ha demostrado que la presencia de surfactantes mejora la cinética de la enzima (Lundbäck et al., 2008), este no ha sido el caso con este constructo (Figura 29), esto puede deberse a que la presencia de surfactantes permite estabilizar regiones hidrofóbicas expuestas (como en las proteínas de membrana), permitiendo un correcto plegamiento. Al no haber este tipo de regiones (dándole un bajo índice de hidrofobicidad superficial), las concentraciones utilizadas no afectaron a la estructura de la proteasa y el constructo. Estos datos concuerdan con los obtenidos en (Sun et al., 2012), en los que se utilizó un blanco con un bajo índice de hidrofobicidad superficial.

El uso de distintos tipos de sales puede tener un efecto en el plegamiento de la proteína, por lo que este efecto va a variar dependiendo su naturaleza y concentración. La proteasa TEV se ha probado frente a distintas concentraciones de NaCl y se vio que su efecto varía entre blancos, en algunos casos la enzima no se ve afectada dentro de un amplio rango (0.1 a 2 M) (Parks et al., 1995) y en otros la presencia en baja concentración mejora la actividad (Nallamsetty et al., 2004). En nuestro caso, la presencia en baja concentración no produce algún efecto, pero al aumentar su concentración la actividad enzimática disminuyó (Figura 29), esto se puede deber al aumento de interacciones proteína-proteína, causando la agregación de del sustrato y disminuyendo la eficiencia de corte. En el caso de la urea, utilizada en el desnaturalización y *refolding* de proteínas debido a sus propiedades caotrópicas, se observó que no permitió el mejoramiento de la actividad enzimática (Figura

29). Esto difiere parcialmente con los resultados obtenidos en (Sun et al., 2012), en él que se indica que la proteasa pierde parte de su actividad al superar una concentración de urea 2M, pero que a 1M se mantiene su actividad completa, aunque en (Lee et al., 2019) se obtienen resultados similares a los nuestros utilizando una concentración de urea 1M frente al constructo de una IDP (Proteína Intrínsecamente Desordenada), por lo que el efecto que puede llegar a tener la urea es dependiente del tipo de sustrato a digerir.

La interacción y efecto que tienen los sacáridos con las proteínas y su plegamiento ha sido ampliamente estudiado (Chang et al., 2005; Singh, 2018; S. Zhang et al., 2021), indicando que estos pueden mejorar o empeorar la estabilidad según la concentración y el sustrato a estabilizar. En nuestro caso, tanto la sacarosa como la trehalosa no permitieron mejorar la eficiencia de corte. En el caso de la sacarosa, se encontró una cita de un paper que indica que concentraciones hasta 2,5 % (m/v) no inhiben la actividad de la enzima (Waugh, 2011), aunque al buscar el paper citado no se encontró. Los resultados obtenidos en presencia de la trehalosa concuerdan con los obtenidos en (Lee et al., 2019), en el cual, al utilizar una concentración de 0,5 M, la actividad enzimática disminuye.

Dentro de los aminoácidos utilizados en procesos de estabilización de proteínas, la arginina es una de las más estudiadas debido a sus características particulares y los efectos que produce en la estructura de proteínas. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos en (Lee et al., 2019), en el que se observa una disminución en la actividad enzimática de la proteasa.

Aunque los resultados indican que no se mejoró la actividad enzimática dentro de las concentraciones utilizadas, estos mismos excipientes se pueden utilizar para estabilizar los productos resultantes luego de la reacción de clivaje en los casos de que sea inestable y tienda a agregarse u oligomerizarse. Hemos ensayado distintas concentraciones de sales, agentes caotrópicos, azúcares y surfactantes que se utilizan generalmente como estabilizantes de formulaciones proteicas.

Como propuesta a futuro, sería interesante ampliar el estudio incluyendo otros excipientes que se usan en formulaciones proteicas, y también aplicar herramientas de modelado molecular o dinámica estructural para entender mejor cómo interactúan los

excipientes con la enzima y/o el sustrato. Esto podría ayudar a diseñar condiciones más adecuadas para mejorar el rendimiento de TEVp frente a blancos complejos.

8. Conclusión

En este trabajo se logró expresar y purificar la proteasa TEV con el objetivo de mejorar su actividad enzimática frente a un sustrato de gran complejidad estructural, utilizando diferentes excipientes, con el fin de mejorar el rendimiento en la obtención de productos de interés.

Para la obtención de las proteínas se usaron técnicas de biología molecular que permitieron expresarlas como proteínas quimeras fusionadas a MBP para mejorar el rendimiento. La purificación de las distintas proteínas se llevó a cabo mediante distintas técnicas cromatográficas que utilizaban su afinidad por algún ligando o por sus propiedades estructurales, obteniendo proteínas puras y una gran homogeneidad estructural.

Durante los ensayos cinéticos, se observó una clara diferencia en el comportamiento de la TEVp frente a los dos sustratos, lo que confirma que la complejidad estructural influye sobre la eficiencia de corte. En los ensayos de optimización, se trabajó con excipientes de distintas características fisicoquímicas para analizar si podían mejorar la actividad enzimática frente al blanco complejo. Sin embargo, incluso probando un rango amplio de concentraciones, no se logró aumentar la actividad frente al sustrato complejo. Esto sugiere que los excipientes evaluados no ayudaron a mejorar la exposición del sitio de corte en ese contexto.

A pesar de eso, muchos de estos excipientes podrían servir como estabilizantes para los productos luego del clivaje, sobre todo si tienden a agregarse o formar oligómeros. Se probaron diferentes tipos de sales, azúcares, detergentes y agentes caotrópicos que suelen utilizarse para estabilizar proteínas en soluciones.

9. Bibliografía

Akers, M. J., Vasudevan, V., & Stickelmeyer, M. (2002). Formulation Development of Protein Dosage Forms. En S. L. Nail & M. J. Akers (Eds.), *Development and Manufacture of Protein Pharmaceuticals* (Vol. 14, pp. 47-127). Springer US.

https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0549-5_2

Allison, R., Johnston, R. E., & Dougherty, W. G. (1986). The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: Evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology*, *154*(1), 9-20.

[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(86\)90425-3](https://doi.org/10.1016/0042-6822(86)90425-3)

Arakawa, T., Ejima, D., Tsumoto, K., Obeyama, N., Tanaka, Y., Kita, Y., & Timasheff, S. N. (2007). Suppression of protein interactions by arginine: A proposed mechanism of the arginine effects. *Biophysical Chemistry*, *127*(1-2), 1-8.

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2006.12.007>

Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1984). Mechanism of protein salting in and salting out by divalent cation salts: Balance between hydration and salt binding. *Biochemistry*, *23*(25), 5912-5923. <https://doi.org/10.1021/bi00320a004>

Arakawa, T., & Timasheff, S. N. (1985). The stabilization of proteins by osmolytes. *Biophysical Journal*, *47*(3), 411-414.

Arakawa, T., Tsumoto, K., Kita, Y., Chang, B., & Ejima, D. (2007). Biotechnology applications of amino acids in protein purification and formulations. *Amino Acids*, *33*(4), 587-605. <https://doi.org/10.1007/s00726-007-0506-3>

Bam, N. B., Cleland, J. L., Yang, J., Manning, M. C., Carpenter, J. F., Kelley, R. F., & Randolph, T. W. (1998). Tween protects recombinant human growth hormone

against agitation-induced damage via hydrophobic interactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 87(12), 1554-1559. <https://doi.org/10.1021/js980175v>

Banks, D. D., Hambly, D. M., Scavezze, J. L., Siska, C. C., Stackhouse, N. L., & Gadgil, H. S. (2009). The effect of sucrose hydrolysis on the stability of protein therapeutics during accelerated formulation studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98(12), 4501-4510. <https://doi.org/10.1002/jps.21749>

Berenbrink, M. (2011). TRANSPORT AND EXCHANGE OF RESPIRATORY GASES IN THE BLOOD | Evolution of the Bohr Effect. En A. P. Farrell (Ed.), *Encyclopedia of Fish Physiology* (pp. 921-928). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00114-3>

Bhatnagar, B. S., Bogner, R. H., & Pikal, M. J. (2007). Protein Stability During Freezing: Separation of Stresses and Mechanisms of Protein Stabilization. *Pharmaceutical Development and Technology*, 12(5), 505-523. <https://doi.org/10.1080/10837450701481157>

Boulware, K. T., Jabaiah, A., & Daugherty, P. S. (2010). Evolutionary optimization of peptide substrates for proteases that exhibit rapid hydrolysis kinetics. *Biotechnology and Bioengineering*, 106(3), 339-346. <https://doi.org/10.1002/bit.22693>

Cabrita, L. D., Gilis, D., Robertson, A. L., Dehouck, Y., Rooman, M., & Bottomley, S. P. (2007). Enhancing the stability and solubility of TEV protease using in silico design. *Protein Science*, 16(11), 2360-2367. <https://doi.org/10.1110/ps.072822507>

Carrington, J. C., Cary, S. M., & Dougherty, W. G. (1988). Mutational analysis of tobacco etch virus polyprotein processing: Cis and trans proteolytic activities of polyproteins containing the 49-kilodalton proteinase. *Journal of Virology*, 62(7), 2313-2320.

<https://doi.org/10.1128/JVI.62.7.2313-2320.1988>

Chang, L. (Lucy), Shepherd, D., Sun, J., Ouellette, D., Grant, K. L., Tang, X. (Charlie), & Pikal, M. J. (2005). Mechanism of protein stabilization by sugars during freeze-drying and storage: Native structure preservation, specific interaction, and/or immobilization in a glassy matrix? *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *94*(7), 1427-1444.

<https://doi.org/10.1002/jps.20364>

Chen, B., Bautista, R., Yu, K., Zapata, G. A., Mulkerrin, M. G., & Chamow, S. M. (2003).

Influence of histidine on the stability and physical properties of a fully human antibody in aqueous and solid forms. *Pharmaceutical Research*, *20*(12), 1952-1960.

<https://doi.org/10.1023/b:pham.0000008042.15988.c0>

Chi, E. Y., Krishnan, S., Kendrick, B. S., Chang, B. S., Carpenter, J. F., & Randolph, T. W.

(2003). Roles of conformational stability and colloidal stability in the aggregation of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *12*(5), 903-913.

Chi, E. Y., Krishnan, S., Randolph, T. W., & Carpenter, J. F. (s. f.). *Physical Stability of*

Proteins in Aqueous Solution: Mechanism and Driving Forces in Nonnative Protein Aggregation.

Dill, K. A. (1990). Dominant forces in protein folding. *Biochemistry*, *29*(31), 7133-7155.

<https://doi.org/10.1021/bi00483a001>

Dougherty, W. G., Carrington, J. C., Cary, S. M., & Parks, T. D. (1988). Biochemical and mutational analysis of a plant virus polyprotein cleavage site. *The EMBO Journal*,

7(5), 1281-1287. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb02942.x>

Dougherty, W. G., Cary, S. M., & Dawn Parks, T. (1989). Molecular genetic analysis of a

plant virus polyprotein cleavage site: A model. *Virology*, 171(2), 356-364.

[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(89\)90603-X](https://doi.org/10.1016/0042-6822(89)90603-X)

- Enríquez-Flores, S., De La Mora-De La Mora, J. I., Flores-López, L. A., Cabrera, N., Fernández-Lainez, C., Hernández-Alcántara, G., Guerrero-Beltrán, C. E., López-Velázquez, G., & García-Torres, I. (2022). Improved yield, stability, and cleavage reaction of a novel tobacco etch virus protease mutant. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(4), 1475-1492. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11786-5>
- Fang, J., Chen, L., Cheng, B., & Fan, J. (2013). Engineering soluble tobacco etch virus protease accompanies the loss of stability. *Protein Expression and Purification*, 92(1), 29-35. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2013.08.015>
- Fatouros, A., & Sjöström, B. (2000). Recombinant factor VIII SQ--the influence of formulation parameters on structure and surface adsorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), 69-79. [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(99\)00369-5](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(99)00369-5)
- Fu, H., Grimsley, G., Scholtz, J. M., & Pace, C. N. (2010). Increasing protein stability: Importance of ΔC_p and the denatured state. *Protein Science*, 19(5), 1044-1052. <https://doi.org/10.1002/pro.381>
- Gokarn, Y. R., Fesinmeyer, R. M., Saluja, A., Razinkov, V., Chase, S. F., Laue, T. M., & Brems, D. N. (2011). Effective charge measurements reveal selective and preferential accumulation of anions, but not cations, at the protein surface in dilute salt solutions. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 20(3), 580-587. <https://doi.org/10.1002/pro.591>
- Goto, Y., & Fink, A. L. (1989). Conformational states in .beta.-lactamase: Molten-globule states at acidic and alkaline pH with high salt. *Biochemistry*, 28(3), 945-952.

<https://doi.org/10.1021/bi00429a004>

Hari, V. (1981). The RNA of Tobacco etch virus: Further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology*, *112*(2), 391-399.

[https://doi.org/10.1016/0042-6822\(81\)90286-5](https://doi.org/10.1016/0042-6822(81)90286-5)

Kamerzell, T. J., Esfandiary, R., Joshi, S. B., Middaugh, C. R., & Volkin, D. B. (2011).

Protein–excipient interactions: Mechanisms and biophysical characterization applied to protein formulation development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *63*(13),

1118-1159. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.07.006>

Kapust, R. B., Tözsér, J., Copeland, T. D., & Waugh, D. S. (2002). The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

294(5), 949-955. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00574-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00574-0)

Katayama, D. S., Nayar, R., Chou, D. K., Valente, J. J., Cooper, J., Henry, C. S., Vander

Velde, D. G., Villarete, L., Liu, C. P., & Manning, M. C. (2006). Effect of buffer species on the thermally induced aggregation of interferon-tau. *Journal of*

Pharmaceutical Sciences, *95*(6), 1212-1226. <https://doi.org/10.1002/jps.20471>

Kim, Y.-S., Jones, L. S., Dong, A., Kendrick, B. S., Chang, B. S., Manning, M. C., Randolph,

T. W., & Carpenter, J. F. (2003). Effects of sucrose on conformational equilibria and fluctuations within the native-state ensemble of proteins. *Protein Science : A*

Publication of the Protein Society, *12*(6), 1252-1261.

Kumar, R. (2009). Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability.

Archives of Biochemistry and Biophysics, *491*(1), 1-6.

<https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.09.007>

Kunz, W., Henle, J., & Ninham, B. W. (2004). ‘Zur Lehre von der Wirkung der Salze’ (about

the science of the effect of salts): Franz Hofmeister's historical papers. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9(1-2), 19-37.

<https://doi.org/10.1016/j.cocis.2004.05.005>

Lee, H. M., Kwon, S. B., Son, A., Kim, D. H., Kim, K.-H., Lim, J., Kwon, Y.-G., Kang, J. S.,

Lee, B. K., Byun, Y. H., & Seong, B. L. (2019). Stabilization of Intrinsically

Disordered DKK2 Protein by Fusion to RNA-Binding Domain. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 2847. <https://doi.org/10.3390/ijms20112847>

Lundbäck, A.-K., Van Den Berg, S., Hebert, H., Berglund, H., & Eshaghi, S. (2008).

Exploring the activity of tobacco etch virus protease in detergent solutions. *Analytical Biochemistry*, 382(1), 69-71. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2008.07.018>

Nakakido, M., Kudou, M., Arakawa, T., & Tsumoto, K. (2009). To be excluded or to bind,

that is the question: Arginine effects on proteins. *Current Pharmaceutical*

Biotechnology, 10(4), 415-420. <https://doi.org/10.2174/138920109788488824>

Nallamsetty, S., Kapust, R. B., Tözsér, J., Cherry, S., Tropea, J. E., Copeland, T. D., &

Waugh, D. S. (2004). Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro. *Protein Expression and Purification*, 38(1), 108-115. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2004.08.016>

Nunn, C. M., Jeeves, M., Cliff, M. J., Urquhart, G. T., George, R. R., Chao, L. H., Tsuchia,

Y., & Djordjevic, S. (2005). Crystal Structure of Tobacco Etch Virus Protease Shows the Protein C Terminus Bound within the Active Site. *Journal of Molecular Biology*, 350(1), 145-155. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.04.013>

Olgrenblum, G. I., Carmon, N., & Harries, D. (2023). Not Always Sticky: Specificity of

Protein Stabilization by Sugars Is Conferred by Protein–Water Hydrogen Bonds.

Journal of the American Chemical Society, 145(42), 23308-23320.

<https://doi.org/10.1021/jacs.3c08702>

Pace, A. L., Wong, R. L., Zhang, Y. T., Kao, Y.-H., & Wang, Y. J. (2013). Asparagine

Deamidation Dependence on Buffer Type, pH, and Temperature. *Journal of*

Pharmaceutical Sciences, 102(6), 1712-1723. <https://doi.org/10.1002/jps.23529>

Parks, T. D., Howard, E. D., Wolpert, T. J., Arp, D. J., & Dougherty, W. G. (1995). Expression

and Purification of a Recombinant Tobacco Etch Virus NIa Proteinase: Biochemical

Analyses of the Full-Length and a Naturally Occurring Truncated Proteinase Form.

Virology, 210(1), 194-201. <https://doi.org/10.1006/viro.1995.1331>

Pavani, P., Kumar, K., Rani, A., Venkatesu, P., & Lee, M.-J. (2021). The influence of sodium

phosphate buffer on the stability of various proteins: Insights into protein-buffer

interactions. *Journal of Molecular Liquids*, 331, 115753.

<https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.115753>

Phan, J., Zdanov, A., Evdokimov, A. G., Tropea, J. E., Peters, H. K., Kapust, R. B., Li, M.,

Wlodawer, A., & Waugh, D. S. (2002). Structural Basis for the Substrate Specificity of

Tobacco Etch Virus Protease. *Journal of Biological Chemistry*, 277(52), 50564-50572.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M207224200>

Pikal, M. J., Dellerman, K. M., Roy, M. L., & Riggin, R. M. (1991). The effects of

formulation variables on the stability of freeze-dried human growth hormone.

Pharmaceutical Research, 8(4), 427-436. <https://doi.org/10.1023/a:1015834724528>

Pyne, A., & Suryanarayanan, R. (2001). Phase Transitions of Glycine in Frozen Aqueous

Solutions and During Freeze-Drying. *Pharmaceutical Research*, 18(10), 1448-1454.

<https://doi.org/10.1023/A:1012209007411>

Raran-Kurussi, S., Cherry, S., Zhang, D., & Waugh, D. S. (2017). Removal of Affinity Tags

with TEV Protease. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1586, 221-230.

https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_14

Shahravan, S. H., Qu, X., Chan, I.-S., & Shin, J. A. (2008). Enhancing the specificity of the

enterokinase cleavage reaction to promote efficient cleavage of a fusion tag. *Protein*

expression and purification, 59(2), 314-319. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2008.02.015>

Singh, S. K. (2018). Sucrose and Trehalose in Therapeutic Protein Formulations. En N. W.

Warne & H.-C. Mahler (Eds.), *Challenges in Protein Product Development* (Vol. 38, pp. 63-95). Springer International Publishing.

https://doi.org/10.1007/978-3-319-90603-4_3

Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. (1990). Buffers: Principles and practice. *Methods in*

Enzymology, 182, 24-38. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82006-n](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82006-n)

Sun, C., Liang, J., Shi, R., Gao, X., Zhang, R., Hong, F., Yuan, Q., & Wang, S. (2012).

Tobacco etch virus protease retains its activity in various buffers and in the presence of diverse additives. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 226-231.

<https://doi.org/10.1016/j.pep.2012.01.005>

Takano, K., Tsuchimori, K., Yamagata, Y., & Yutani, K. (2000). Contribution of Salt Bridges

near the Surface of a Protein to the Conformational Stability. *Biochemistry*, 39(40),

12375-12381. <https://doi.org/10.1021/bi000849s>

Tang, J. (2004). 3—Pepsin A. En A. J. Barrett, N. D. Rawlings, & J. F. Woessner (Eds.),

Handbook of Proteolytic Enzymes (Second Edition) (pp. 19-28). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-079611-3.50011-2>

Tarelli, E., Corran, P. H., Bingham, B. R., Mollison, H., & Wait, R. (1994). Lysine vasopressin

undergoes rapid glycation in the presence of reducing sugars. *Journal of*

Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 12(11), 1355-1361.

[https://doi.org/10.1016/0731-7085\(94\)00098-0](https://doi.org/10.1016/0731-7085(94)00098-0)

Thomas, A. S., & Elcock, A. H. (2007). Molecular Dynamics Simulations of Hydrophobic

Associations in Aqueous Salt Solutions Indicate a Connection between Water

Hydrogen Bonding and the Hofmeister Effect. *Journal of the American Chemical*

Society, 129(48), 14887-14898. <https://doi.org/10.1021/ja073097z>

Tian, F., Middaugh, C. R., Offerdahl, T., Munson, E., Sane, S., & Rytting, J. H. (2007).

Spectroscopic evaluation of the stabilization of humanized monoclonal antibodies in

amino acid formulations. *International Journal of Pharmaceutics*, 335(1-2), 20-31.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.10.037>

Tropea, J. E., Cherry, S., & Waugh, D. S. (2009). Expression and Purification of Soluble

His6-Tagged TEV Protease. En S. A. Doyle (Ed.), *High Throughput Protein*

Expression and Purification (Vol. 498, pp. 297-307). Humana Press.

https://doi.org/10.1007/978-1-59745-196-3_19

Videla Garrido, A. (2022). *Producción recombinante de un péptido derivado del antígeno*

Hcp100 de Histoplasma capsulatum para su potencial uso en el diagnóstico de la

histoplasmosis [Thesis, Universidad de Belgrano - Facultad de Ciencias Exactas y

Naturales - Licenciatura en Ciencias Biológicas].

<http://repositorio.ub.edu.ar/handle/123456789/9682>

Wade, A. M., & Tucker, H. N. (1998). Antioxidant characteristics of L-histidine 1. *The*

Journal of Nutritional Biochemistry, 9(6), 308-315.

[https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(98\)00022-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(98)00022-9)

Zhang, M. Z., Wen, J., Arakawa, T., & Prestrelski, S. J. (1995). A new strategy for enhancing the stability of lyophilized protein: The effect of the reconstitution medium on keratinocyte growth factor. *Pharmaceutical Research*, 12(10), 1447-1452.

<https://doi.org/10.1023/a:1016219000963>

Zheng, J. Y., & Janis, L. J. (2006). Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *International Journal of Pharmaceutics*, 308(1-2), 46-51.

<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.10.024>

10. Anexos

10.1. Anexo 1: Secuencia del plásmido MBP-TEV-S219V

atatctcactcgcaatcaaattcagccgatagcggaaacgggaaggcgactggagtccatgtccggtttcaacaacca
tgcaaatgctgaatgagggcatcgttcccactgcgatgctgggtgccaacgatcagatggcgctgggcgcaatgcgcgcc
attaccgagtcgggctgcgcgttggtgcggatctcggtagtgggatacgcgataccgaagacagctcatgttatat
cccgcgtaaccacatcaaacagatttccctgctggggcaaaccagcgtggaccgcttctgcaactctctcagg
gccaggcggtgaagggaatcagctgttcccgtctcactggtgaaaagaaaaccacctggcgccaatacgcacaacc
gcctctcccgcgcgttggccgattcattaatgcagctggcacgacaggttcccgactggaaagcgggcagtgagcgca
acgcaattaatgtaagttagctcactcattaggcacaattctcatgtttgacagcttatcgcactgcacggtgcacca
atgcttctggcgtcaggcagccatcggaagctgtggfatggctgtgcaggctgtaaatcactgcataatcgtgtcgtc
aaggcgcactcccgttctggataatgtttttgcgccgacataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttg
acaattaatcctcggtcgtataatgtgtggaattgtgagcggataacaattcacacaggaaacagccagtcctgttag
gtgttttcacgagcacttcaccaacaaggaccatagattatgaaaactgaagaaggtaaacgtgtaactggtattaacgg
cgataaaggctataacggctcgtgtaagtcggtaagaaatcgagaaagataccggaattaaagtcaccgttgagcatc
cggataaactggaagagaaattcccacaggttgcggcaactggcgatggccctgacattatcttctgggcacacgaccgc
tttgggtgctacgtcaatctggcctgttggctgaaatcacccggacaaagcgttccaggacaagctgtatccgtttac
ctgggatgccgttacgttacaacggcaagctgattgcttaccgatcgtgttgaagcgttatcgtgattatacaaaag
atctgctgccgaaccgccaaaaacctgggaagagatcccggcgctggataaagaactgaaagcgaaggttaagagcgcg
ctgatgttaacctgcaagaaccgtacttccctggcctgattgctgctgacgggggttatgcttcaagatgaaaa
cggcaagtacgacattaaagacgtgggcgtggataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttctggttgacctgatta
aaaaacaacacatgaatgcagacaccgattactccatcgagaagctgcctttaataaaggcgaacagcagtgaccatc
aacggcccgtggcatggtccaacatcgacaccagcaaagtgaattatggtgtaacggctactgccacctcaagggtca
accatcaaaccgttctggtggcgtgctgagcgcaggtattaacgccgccagtcgcaacaagagctggcaaaagagttcc
tcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctggaagcggtaataaagacaaaaccgctgggtgccgtagcgtgaagct
tacgaggaagagttggcgaagatccacgtattgcccaccatggaaaacgccagaaaggtgaaatcatccgcaacat
cccgcagatgtccgttctggtatgccgtgctactgcggtgatcaacgccgccagcggctcagactgtcagatgaag
cctgaaagacgcgcagactaatcagctcgaacaacaacaataacaataacaacaacctcgggacgcaggggaagg
ggagaaaatctttatttcaaggtcatcatcatcatcatcatggagaaagctgtttaaagggggccgcgtgattaca
cccgatcgcagcaccatttgcatttgacgaatgaatctgatgggcacacaacatcgttctgtattggtattggtc
cttcatcattacaacaagcactgtttagaagaaataatggaacactgttggccaatcactacatggtgattcaag
gtcaagaacaccagactttgcaacaacacctcattgatgggagggacatgataattatcgcagcctaaggtttccc
accatttctcaaaagctgaaattagagagccacaaaggggaagagcgcgatatgtcttgacaaccaacttcaaaacta
agagcatgtctagcatggtgtcagacactagttgcacattcccttcatctgatggcattctggaagcattggattcaa
accaaggtgggcagtggtgagcagtcattagatcaactagagatgggttcattgttggtatacactcagcatcgaatt
caccaacacaaacaattttcacaagcgtgccgaaaaactcattggaattgtgacaaatcaggaggcgcagcagtggg
ttagtgttggcgattaaatgctgactcagattgtggggggccataaaagtttcatggtgaaacctgaagaccctttt
cagccagttaaaggaagcgcactcaactcatgaatcgtcgtcgcctgctgtaataaggatccttagagtcgacctcagggc
aagcttggcactggcctgcttttacaacgtcgtgactgggaaaacctggcgttaccacttaatacgccttgcagcac

atcccccttcgccagctggcgtaatagegaagaggcccgaccgatcgcccttccaacagttgcgcagcctgaatggc
gaatggcagcttggctgtttggcggatgagataagattttcagcctgatacagattaatcagaacgcagaagcggct
gataaacagaatttgcctggcggcagtagcgcgggtggtccacctgacccatgccgaactcagaagtgaacgccgta
gcgccgatggtagtgtggggctccccatgcgagagtagggaactgccaggcatcaataaacgaaaggctcagtcgaa
agactgggcctttcgtttatctgtgtttgctgggtgaacgctctctgagtaggacaaatccgccgggagcggattga
acgttgcgaagcaacggccggagggtggcgggcaggacgccgccataaactgccaggcatcaattaagcagaaggcc
atcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactctttgtttttttaaatacattcaaatatgtatccgctca
tgagacaataacctgataaatgctcaataatattgaaaaaggaagatgagattcaacatttccgtgctgccctt
attccctttttgcggcattttgccttctgttttgcctaccagaacgctggtgaaagttaaagatgctgaagatca
gttgggtgcacgagtggttacatcgaactggatcacaacagcggtaagatcctgagagttttgccccgaagaacgtt
tccaatgatgagcacttttaagttctgctatgtggcgggtattatccgtgtgacgccgggcaagagcaactcgg
cgccgcatacactattctcagaatgacttgggtgagctaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagt
aagagaattatgagtgctgccataacctgagtgataaactgcggccaacttactctgacaacgatcggaggaccga
aggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagcc
ataccaacgacgagcgtgacaccacgatgcctgtgcaatggcaacaacgttgcgcaactattaactggcgaactact
tactctagcttccggcaacaattaactgactggatggaggggataaaagttgcaggaccacttctgcgctcggccctc
cggctggctggtttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagat
ggtaaagccctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgta
gataggtgctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttaccgggt
tgataatcagaaaagccccaaaaacaggaagattgtataagcaaatatttaaattgaaacgttaataattttgttaaat
tcgcgttaaattttgttaaatcagctcatttttaaccaatagccgaaatcggcaaaatcccttataaatcaaaagaa
tagcccgagataggggtgagtggttccagtttgaacaagagtcactattaagaacgtggactccaacgtcaaaagg
gcgaaaaaccgtctatcagggcgatggccactacgtgaacctaccccaatcaagtttttggggtcgaggtgccgta
aagcactaaatcggaaaccctaaaggagccccgatttagactgacgggaaagccggcgaacgtggcgagaaaaggaa
gggaagaaaagcgaaggagcgggcgctagggcgctgcaagtgtagcggtcacgctgcgcgtaaccaccacaccgcccgc
gcttaatgcgccgctacagggcgctaaaaggatctaggtgaagatccttttgataatctcatgacaaaaatccctaa
cgtgagtttctgctcactgagcgtcagaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgct
aatctgctgcttgcacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtgtttgttccggatcaagagctaccaactcttttc
cgaaggtaactggcttcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtgtagccgtagtttagccaccactcaag
aactctgtagcaccgctacatacctcgtctgtaactctgttaccagtggtgctgccagtggcgataagtcgtgct
taccgggttgactcaagacgatagttaccggataagcgcagcggctgggctgaacgggggggtcgtgcacacagccca
gcttggagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcaccgcttcccgaagggaga
aaggcggacaggtatccgtaagcggcagggcggaaacaggagagcgcacgaggagcttccagggggaaacgcctgta
tctttatagctctgcgggttccaccctctgactttagcgtcattttgtgatgctcgcagggggggcggagcctat
ggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggcttctggccttttctggtccttttctcactgtcttctcgtgta
tcccctgattctgtgataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcag
cgagtcagtgagcaggaagcggaaagagcgcctgatcggtattttctcttacgcatctgtcgggtatttccaccgca
tatggtgactctcagtaaatctgctctgatccgcatagttaaagcagatatacactccgctatcgtactgactggg
tcatggtgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggcttctgctcctccggcatccgcttacaga
caagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttaccgctatcaccgaaacgcgcgagggcagctgcggta

aagctcatcagcgtggctgctgcagcgattcacagatgtctgcctgttcatccgcgtccagctcgttgagttctccagaa
gcgtaatgtctggcttctgataaagcgggcatgtaaggcggttttctggttggctactgatgcctccgtgtaa
gggggatttctgttcatggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatgaaca
tccccggttactggaacggttgtagggtaaacactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagggtc
aatgccagcgttctgtaatacagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcctcctgcgatgcagatccggaacata
atggtgcagggcgctgacttccgcgttccagactttacgaaacacggaaccgaagaccattcatgttgttgcaggt
cgcagacgtttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcgggtattcattctgctaaccagtaaggaacccc
gccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcccaccctggccaggaccaacgctgccgaaattccg
acaccatcgaatggtgcaaacctttcgcggtatggcatgatagcggcggagagagagtaattcagggtggtgaatgtg
aaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagatgccgggtgtcttatacagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggccag
ccacgtttctgcgaaacgcgggaaaaagtggaaagcggcagatggcggagctgaattacattccaaccgcgtggcacaac
aactggcgggcaaacagtcgttgcgtgattggcgttccacctccagcttggccctgcacgcgccctgcgaaattgtcgcg
gcatgataatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtcgcgatgtagaacgaagcggcgtcgaagcctgtaa
agcggcgggtgcacaattctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgccattg
ctgtggaagctgcctgcaactatgttccggcgttatttctgatgtctctgaccagacacctcaacagtattttt
tccatgaagacgggtacgcgactggcgctggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcgggccc
attaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggcgcataa

10.2. Anexo 2: Secuencia del plásmido MBP-fHcp100

ccgacaccatcgaatggtgcaaacctttcgcggtatggcatgatagcggcggagagagagtaattcagggtggtgaat
gtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagatgccgggtgtcttatacagaccgtttcccgcgtggtgaaccaggc
cagccacgtttctgcgaaaacgcgggaaaaagtggaaagcggcagatggcggagctgaattacattccaaccgcgtggcac
aacactggcgggcaaacagtcgttgcgtgattggcgttccacctccagcttggccctgcacgcgccctgcgaaattgtc
gcccgcattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtcgcgatgtagaacgaagcggcgtcgaagcctg
taaagcggcgggtgcacaattctcgcgcaacgcgtcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgcca
ttgctgtggaagctgcctgcaactatgttccggcgttatttctgatgtctctgaccagacacctcaacagtattatt
tttccatgaagacgggtacgcgactggcgctggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgttagcggg
cccattaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctggctggctggcataaatctcactcgcgaatcaaatcagccgatag
cggaaacgggaagcgcactggagtgccatgtccggtttcaacaacatgcaaatgctgaatgagggcacgttcccact
gcgatgctggttccaacgatcagatggcgcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcgttgggtgcgga
tatttcggtagtgggatacagcagataccgaagacagctcatgttatatcccggcgttaaccacatcaaacaggatttc
gcctgctggggcaaacagcgtggaccgcttgcgcaactctcaggccaggcgggtgaaggcaatcagctgttcccc
gtctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgccaatacgaaccgcctctcccgcgcttggccgattcattaat
gcagctggcacagcaggtttcccactggaaagcgggcagtgagcgcgaacgaattaatgtaagtagctcactcattag
gcacaattctatgtttgacagcttatacgcactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaagct
gtggtatggctgtcaggtcgtaaatcactgcataatcgtcgtcgaaggcgcactcccgttctggataatgttttt
gcccgcacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatcggtcgtataatgtgtgga
attgtgagcggataacaatttcacacaggaacagccagtcctgttaggtgttttcagagcaattgaccaacaaggacc

atagattatgaaaatcgaagaaggtaaactggtaactctggattaacggcgataaaggctataacggctcgcgtgaagtcg
gtaagaaattcgagaaagataaccggaattaaagtcaccgttgagcatccggataaactggaagagaaattccacaggtt
gctggcaactggcgatggcctgacattatctctgggcacacgaccgcttgggtggctacgctcaatctggcctgttggc
tgaaatcaccggcacaagcgttccaggacaagctgtatccgtttacctgggatgccgtacgttacaacggcaagctga
ttgcttaccgatcgtgttgaagcgttatcgtgatttataacaagaatctgctgccgaaccggcacaacacctgggaa
gagatccggcgctggataaagaactgaaagcgaaggtgaagagcgcgctgatgttcaactgcaagaaccgtacttca
ctggcgcgtgattgctgctgacgggggttatgcttcaagatgaaaacggcaagtacgacattaagacgtgggcgtgg
ataacgctggcgcgaaagcgggtgaccttctggtgacctgattaaaaacaacacatgaatgcagacaccgattac
tccatcgcagaagctgctttaaataaaggcgaacagcgatgacctcaacggcccgtgggatggtccaacatcgacac
cagcaaatgaattatggtgtaacgggtactgccgacctcaagggtcaacctcaaaccttctggtggcgtgctgagcg
caggtattaacggcggcagtcgcaaaaagagctggcaaaaaggttctcgaaaactatctgctgactgatgaaggtctg
gaagcggtaataaagacaaaaccgctgggtgcccgtagcgcgtgaagcttacgaggaagagttggtgaaagatccgctg
tgccgccatgaaacggcagaaaggtgaaatcatgccgaacatcccgagatgcccgttctggtatgccgtgc
gtactgctgatcaacggcggcagcggctgctgactgctgatgaagcctgaaagacgcgcagactaatcgagctcg
aacaacaacaataacaataacaacaacctggggatgacgatgacaaggtaccgcatatgcccattggcgccgca
tategctgacggatccgaattcctgcaggttaataaataagcttcaataaaacgaaaggctcagtcgaaagactgggc
cttctgtttatctgttgttctggtgaaacgctctctgagtaggacaaatccggcgggagcggattgaaactgcca
agcaacggcccggagggtggcggcaggacggcggcacaataactgccaggtcaaatgagaagggcctcctgacg
gatggccttttgcgttctacaactcttctggctcgttgttttttctaaatacattcaaatatgtatccgctcat
gagacaataaccctgataaatgcttcaataatgaaaaaggaagatgagatattcaacattccgtgctgccctta
ttcccttttgcggcattttgccttctgttttctcaccagaaacgctgggtaaagtaaaagatgctgaagatcag
ttgggtgacgagtggttacatcgaactggatctcaacagcggtaagatccttgagagtttcccccgaagaactgtt
cccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatccgtgtgacggcggcagagcaactcggtc
ggcgatacactattctcagaatgacttgggtgagttactaccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagta
agagaattatgagtgctgccataacctgagtgataaactgcccgaacttacttctgacaacgatcggaggaccgaa
ggagtaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaaccggagctgaatgaagcca
taccaaacgacgagcgtgacaccacgatccctgtagcaatggcaacaactgtgcgcaactattaactggcgaactact
actctagcttcccggcaacaataatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccacttctgctcggccttcc
ggctggctggttattgctgataaatctggagccgggtgagcgtgggtctcgcggtatcattgcagcactggggccagatg
gtaagcctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgtgag
ataggtgctcactgattaagcattggttaactgtcagaccaagttactcatatatactttagattgatttcttaggac
tgagcgtcaaccccgtagaaaagatcaaaggatcttctgagatcctttttctgcgcgtaactctgctgcttgcaca
aaaaaccaccgctaccagcgggtgttggccgatcaagactaccaactctttccgaaggttaactggcttgcag
cagagcgcagataccaataactgtccttctagttagccttagttagccaccacttcaagaactctgtagcaccgcta
catacctcgtctgtaactctgttaccagtggtgctgctccagtggcgataaagtcgtgcttaccgggttgactcaaga
cgatagttaccggataaggcgcagcggcgggctgaacggggggttcgtgcacacagcccagcttggagcgaacgacct
caccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagcggcagcctcccgaagggagaaaggcggacaggtatccgg
taagcggcagggtcggaacaggagagcgcacgaggagcttccaggggaaacgctggtatctttatagctcgtcggg
tttccacctctgactgagcgtcgtttttgtgatgctcgtcagggggggcggagcctatggaaaaacgacgcaacgc
ggccttttaccggttctggccttttctggccttttctcactgcatgttcttctgcttaccctgattctgtggata

accgtattaccgcctttgagtgagctgataccgctcgcgcagccgaacaccgagcgcagcagtcagtgagcaggaa
gcggaagagcgcctgatgcggtatcttccttacgcatctgtgcggtatctcacaccgcatataaggtgactgtgact
gggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgcctgacgggctgtctgctcccggcatccgcttac
agacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtcagaggtttcaccgatcaccgaaacgcgcgaggcagctgcg
gtaaagctcatcagcgtggctgtgcagcgattcacagatgtctgctgttcatccgctccagctcgttgagtttcca
gaagcgttaagtgtctggcttctgataaagcgggcatgtaaggcgggttttctgtttggtcactgatgcctccgtg
taagggggatttctgttcatgggggtaatgataccgatgaaacgagagaggatgctcacgatacgggttactgatgatga
acatgcccgggtactggaacgttgtgagggtaaaactggcggtatggatgcggcgggaccagagaaaaatcactcagg
gtcaatgccagcgtctgtaatacagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcatctgcgatgcagatccggaac
ataatggtgcagggcgtgacttccgctttccagactttacgaaacacggaaaccgaagaccattcatgttgttctca
ggctgcagacgtttgcagcagcagtcgcttccgctcgcgtatcgggtgattcattctgtaaccagtaaggcaac
cccggcagcctagccgggtctcaacgacaggagcacgatcatgcgcaccggtggccaggaccaacgctgcccgaatt

10.3. Anexo 3: Secuencia del plásmido MBP-CCNA2(Δ 171)

ccgacaccatcgaatggtgcaaaaccttcgcggatggcatgatagcgcgggaagagagtcattcagggtggtgaat
gtgaaaccagtaacgttatacagatgtcgcagagatgcccgtgtctcttatcagaccgttcccgcgtggtgaaccaggc
cagccacgtttctcgaaaacgcgggaaaaagtggaaagcggcgatggcggagctgaattacattccaaccgctggcac
aacaactggcgggcaaacagctgttctgattggcgttccacctccagctggcctgcacgcgcctcgcaattgtc
gcggcgattaaatctcgcgccgatcaactgggtgccagcgtgggtggtcgcgatggtagaacgaagcggcgtcgaagcctg
taaagcggcgggtgcacaatctctcgcgcaacgcgctcagtgggctgatcattaactatccgctggatgaccaggatgcca
ttgctgtggaagctgcctgactaatgttccggcgttatttctgtatgtctctgaccagacacccatcaacagtattatt
ttctccatgaagacggtacgcgactggcggtggagcatctggtcgcattgggtcaccagcaaatcgcgctgtagcggg
cccattaagtctgtctcggcgcgtctgcgtctggtggtggcataaatactcactcgaatcaaatcagccgatag
cggaaagggaaggcactggagtgccatgtccggtttcaacaacctgcaaatgctgaatgagggcagcgttcccact
gcgatgctggtgccaacgatcagatggcgcgtggcgcaatgcgcgccattaccgagtcgggctgcgcggtggtgcgga
tatttcggtagtgggatacagacataccgaagacagctcatgttatatcccgcggttaaccatcaaacaggatttcc
gcctgctggggcaaacaccagcgtggaccgcttctgcaactctcagggccaggcgggtgaagggaatcagctgttccc
gtctcactggtgaaaagaaaaaccacctggcgccaatcgcgaaccgcctctcccgcgcgttggccgattcattaat
gcagctggcagcagaggttcccactggaaagcgggcagtgagcgcacgcaatgaatgtaagttagctcactcattag
gcacaattctatgtttgacagcttatcagactgcacggtgcaccaatgcttctggcgtcaggcagccatcggaaagct
gtggtatggctgtcaggtcgtaaatcactgcataatcgtgtcgtcgaaggcgcactcccgttctggataatgttttt
gcgccgacatcataacggttctggcaaatattctgaaatgagctgttgacaattaatcatcggctcgtataatgtgtgga
attgtgagcggataacaattcacacaggaaacagccagtcctggttaggtgtttcacagcaattgaccaacaaggacc
atagattatgaaaatcgaagaaggtaaaactggttaacttgattaacggcgataaaggctataacggctcgcgtgaagtcg
gtaagaaattcgagaaagataccggaattaaagtcaccggtgagcatccggataaactggaagagaaattcccacaggtt
gcggcaactggcgtatggcctgacattatcttctgggcacacgaccgcttgggtggctacgctcaatcggcctgtggc
tgaaatcaccgggacaaaagcgttccaggacaagctgtatccgtttacctgggatccgtacgttacaacggcaagctga

ttgcttaccgatcgtgtgaagcggtatcgtgattataacaaagatctgctgccgaaccgcaaaaacctgggaa
gagatcccggcgctggataaagaactgaaagcgaaaggtgaagagcgcgctgatgtcaacctgcaagaaccgtacttca
ctggccgctgattgctgtagcgggggtatgcttcaagtatgaaaacggcaagtacgacattaagacgtggcgctgg
ataacgctggcgcgaaagcgggtctgaccttctggtgacctgattaaaaacaacacatgaatgcagacaccgattac
tccatcgcagaagctgccttaataaaggcgaaacagcgatgaccatcaacggcccgtgggcatggtccaacatcgacac
cagcaaagtgaattatggtgtaacgggtactgccgacctcaagggtcaacctcaaacggttcgttggcgctgctgagcg
caggtattaacgccccagtcgcaaaaagagctggcaaaaagagtctctgaaaactatctgctgactgatgaaggtctg
gaagcggtaataaagacaaaccgctgggtgcccgtagcgcgtgaagtcttacgaggaagagttggtgaaagatccgcgat
tgccgccactatgaaaacgcccagaaaggtgaaatcatgccgaacatcccgcagatgtccgcttctggtatgccgtgc
gfactgcgggatcaacgccccagcggctcagactgctgatgaagccctgaaagacgcgcagactaatcagctcgc
aacaacaacaataacaataacaacacctgggctcagggaaaggttccatatactagtagtaccaggggaagtca
tcaccaccaccacggcggtggcggcagcgaaaacctgtacttccagggtgtgcctgactaccagaggacatccaca
cctacctgagagagatggaagtgaagtgaagccgaaggtcgggtatgaaaaacaaccggacatccaatagcatg
cgtgcaatcctggtggactggctggtagaggtggcgaagagtataaactcagaatgaaacgtgcaacttggcggttaa
ctatacgaccgtttctctagcatgagcgtttgctggtgaaactgcaactggctcgaaccgcagctatgctgttgg
cgagcaaatgtgagaaatcccgccagaggtgcggaatcgtgtatattaccgatgatacctacacaaaaaacag
gttttgcgatggaacatctggtcctgaaagtctgactttgatctggcggctccgacctgaaccagtcttgacgca
gtattcttgaccagcaaccggcaactgcaaggtggagctttagctatgttcttaggtgagctgtccctgattgacg
cggaccctatcttaagtacctgccgagcgttattgggggtgccgcttcatctggcctgtataaccgttaccggccag
agctggccggagtcctcatccgtaaaaccggtatacgtggaatcgtgaagccgtgtctgatggatctgcatcaaac
gtaccttaaggcgcacagcatgcgcaacaatccatccgcgagaaatacaagaactccaagtaccacgggtgagcttgc
tgaaccgcccgaactctgaatgtgaagatccgaatccctgcaggttaataaataagctcaataaaacgaaagg
ctcagtcgaaagactggccttctgtttatctgttgttgcggtgaacgctctcctgagtaggacaaatccgccggga
gcccgtttgaaactggaagcaacggcccggagggtggcggcaggacgcccgcataaactgccaggcatcaaatgaa
gcagaaggccatcctgacggatggccttttgcgtttctacaaactcttccggtccgtgttttttctaaatacatt
caaatatgatccgctcatgagacaataaccctgataaatgcttcaataatattgaaaaggaagatgagtattca
cattccgctgctgcccttattccctttttgcccgttttgccttctgttttgcctcaccagaaaacgctggtgaaagt
aaaagatgctgaagatcagttgggtgcacagtggttacctgaactggatcacaacagcggtaagatccttgagagtt
ttcggcccgaagaacttccaatgatgagcacttttaaagtctgctatgtggcgcggtattatcccgtgtgacgcc
gggcaagacaaactcggctgccgcatacattctcagaatgacttgggtgagtagtaccagtcacagaaaagcatct
tacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtctgccataacctgagtgataaacactcggccaacttacttctga
caacgatcggaggaccgaaggagctaaccgctttttgcacaacatgggggatcatgtaactgccttgatcgttgggaa
ccggagctgaatgaagccatacaaacgacgagcgtgacaccagatgcctgtagcaatggcaacaacgttgcgcaaac
attaactggcgaactacttacttagcttcccggcaacaattaatagactggatggaggcggataaagtgcaggaccac
ttctgcgctcggccttccggctggctggtttattgctgataaatctggagccggtgagcgtgggtctcgcggtatcatt
gcagcactggggccagatggtgaaagcctcccgtatcgtatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacg
aaatagacagatcgtgagataggtgcctcactgattaagcattgtaactgtcagaccaagtttactatatacttt
agattgatttcttaggactgagcgtcaacccgtagaaaagatcaaaagatcttctgagatcctttttctgcgct
aatctgctgcttgaacaacaaaaaacaccgctaccagcgggtggtttgttccggatcaagagctaccaactcttttc
cgaaggtaactggctcagcagagcgcagataccaataactgtccttctagtagccgtagtagccaccacttcaag

aactctgtagcaccgcctacatacctcgtctgctaatcctgttaccagtggctgctgccagtggcgataagtcgtgtct
taccgggttgactcaagacgatagttaccggataagggcagcggctcggctgaacgggggggttcgtgcacacagccca
gcttgagcgaacgacctacaccgaactgagatacctacagcgtgagctatgagaaagccacgctcccgaagggaga
aaggcggacaggtatccgtaagcggcagggctcggaacaggagagcgcacgagggagcttccagggggaaacgctggtgta
tcttatagtcctgtcgggttcgccacctgacttgagcgtcattttgtgatgctcgcagggggggcggagcctat
ggaaaaacgccagcaacgcggccttttacggctctggccttttctgctggccttttctcacatgttcttctcgcgtta
tcccctgattctgtggataaccgtattaccgctttgagtgagctgataccgctcggcagccgaacgaccgagcgcag
cgagtcagtgagcaggaagcgggaagagcgcctgatcggtattttctccttacgcatctgtcggtatttcacaccgca
tataagtgactgtgactgggtcatggctgcgccccgacaccgccaacaccgctgacgcgacctgacgggcttgtct
gctcccggcatccgcttacagacaagctgtgaccgtctccgggagctgcatgtgtagaggtttccaccgtatcaccga
aacgcgcgagcagctcggtaaagctcagcgtggtcgtgagcagattcacagatgtctgctgttcatccgcgtcc
agctcgtgagtttccagaagcgttaagtctggcttctgataaagcgggcatgtaaggcggttttctcgttt
ggcactgatgctccgtgtaagggggatttctgttcatgggggtaataaccgatgaaacgagagaggatgctcacga
tacgggttactgatgatgaacatcccgggttactggaacgttgtaggggtaaacactggcggtatggatgcggcgggac
cagagaaaaatcactcagggtaatgccagcgttcgtaatacagatgtaggtgtccacagggtagccagcagcatcc
tgcgatgcagatccggaacataatggtgcagggcgtgacttccgcttccagactttacgaaacacggaaaccgaaga
ccattcatgttgtgctcaggtcgcagacgtttgcagcagcagtcgcttcacgttcgctcgcgtatcggtgattcattc
tgtaaccagtaaggcaacccccgccagcctagccgggtcctcaacgacaggagcacgatcatgcgcacccgtggccagga
cccaacgctgcccgaatt

10.4. Anexo 4: Cálculo de masa total y rendimiento por litro de cultivo de TEVp

En la purificación de TEVp por SEC, se obtuvo unos 7 mL de la fracción 2 con una concentración de 0,66 µg/µL, dando 4,62 mg de proteasa. Debido a que solo se purificó 1 mL del total del eluido obtenido en la purificación por IMAC, aproximadamente 10,2 mL, se multiplicó la masa obtenida por el volumen de muestra obtenido, dando una masa total de 47,12 mg de proteasa (2). Para obtener el rendimiento, se dividió la masa total por el volumen de medio de cultivo preparado para obtener la masa total (2 Litros) (3).

$$Masa\ total = \frac{0,66 \frac{mg}{mL} \times 7\ mL \times 10,2\ mL}{1\ mL \times} = 47,12\ mg \quad (2)$$

$$Rendimiento\ por\ litro\ de\ cultivo = \frac{47,12\ mg}{2\ litros} = 23,56 \frac{mg}{Litro\ de\ cultivo} \quad (3)$$

10.5. Anexo 5: Datos de cinética enzimática frente a MBP-fHcp100

Tiempo de incubación (min)	Pico 1 (%)	Pico 2 (%)	1/Tiempo de incubación (min ⁻¹)	1/Pico 2 (% ⁻¹)
5	78	22	0,2	0,046
15	62	38	0,067	0,026
30	53	47	0,033	0,021
60	47	53	0,017	0,019
120	39	61	0,008	0,016
240	32	68	0,004	0,015

10.6. Anexo 6: Datos de cinética enzimática frente a MBP-CCNA2(Δ171)

Tiempo de incubación (min)	Pico 1 (%)	Pico 2 (%)	Pico 3 (%)	Pico digerido (%)	1/Tiempo de incubación (min ⁻¹)	1/Pico digerido (% ⁻¹)
5	90	4	5	9	0,2	0,103
15	79	10	11	21	0,067	0,048
30	66	16	18	34	0,033	0,029
60	46	25	29	54	0,017	0,019
120	26	34	40	74	0,008	0,014
240	12	41	47	88	0,004	0,011