



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA



UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS - ESPE DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA AGRICULTURA CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERA BIOTECNÓLOGA

“Evaluación de las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria”

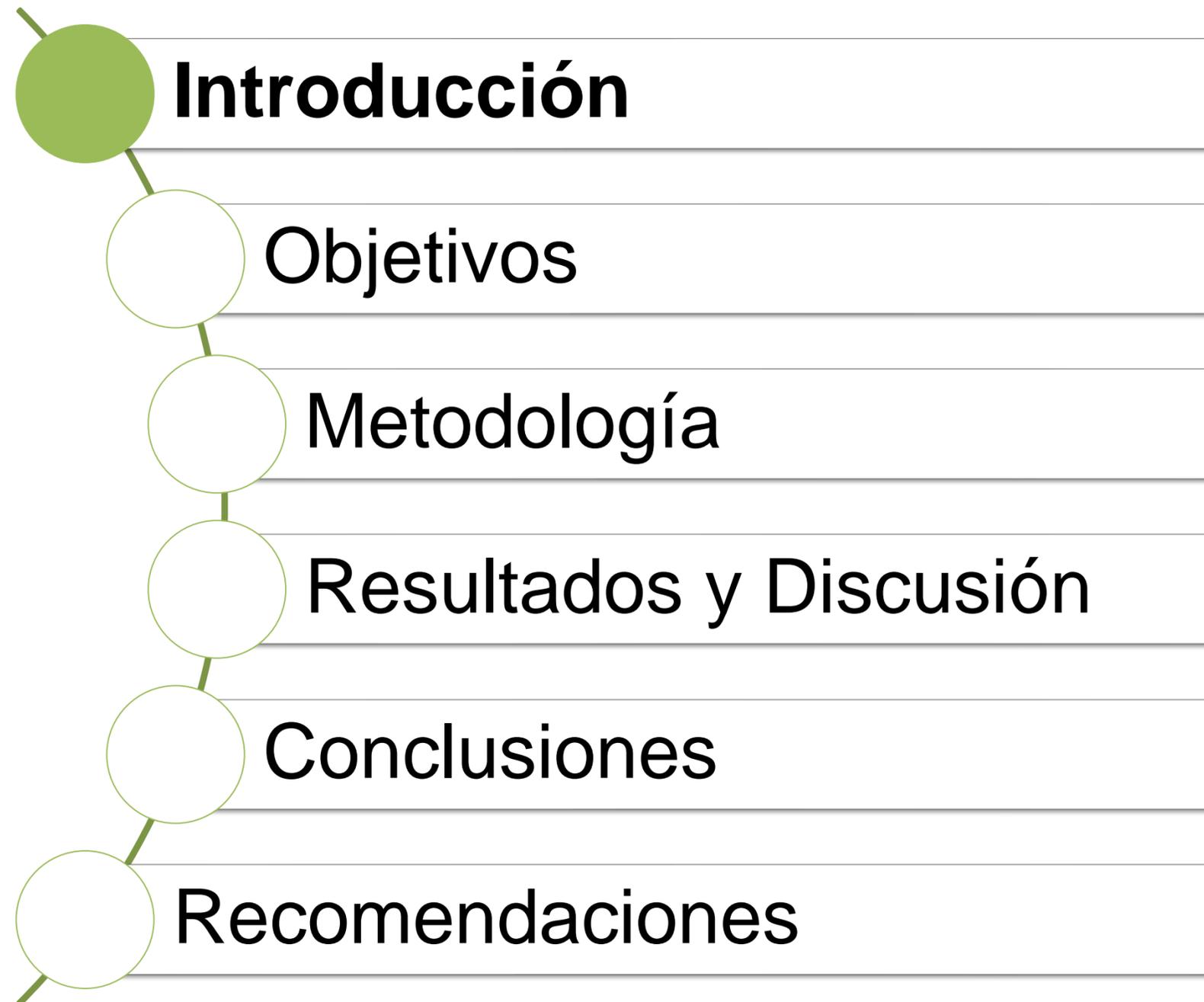
Autora: Gabriela Nicole Paredes Ramos

Directores: Dra. Thelvia Isabel Ramos Gómez, PhD(c)
Dr. Jorge Roberto Toledo, PhD

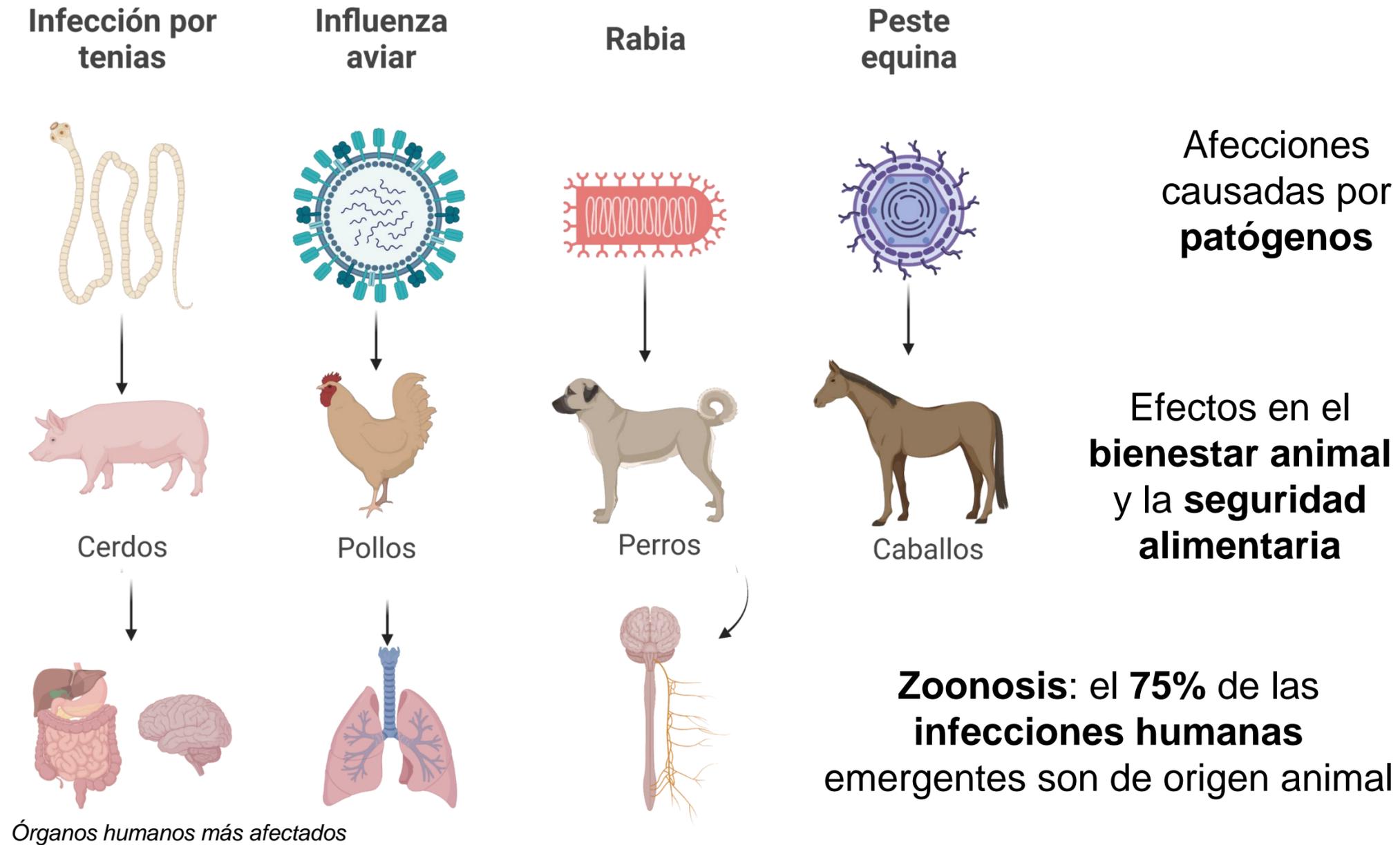
Sangolquí, 08 de marzo de 2023



- Introducción
- Objetivos
- Metodología
- Resultados y Discusión
- Conclusiones
- Recomendaciones



Enfermedades infecciosas de los animales

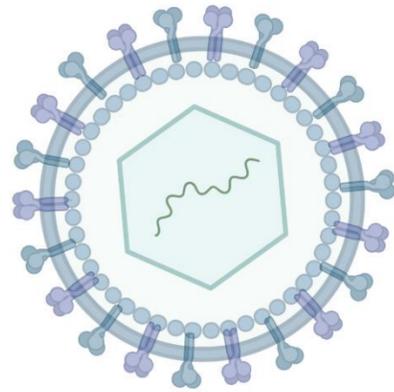


Vacunas

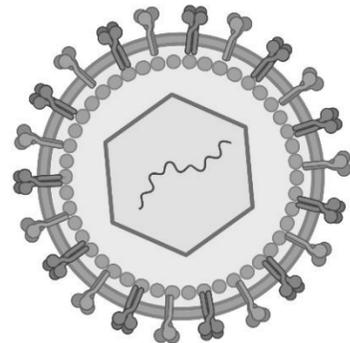


Vacunas convencionales y de nueva generación

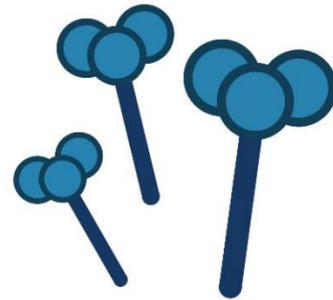
a. Vivas atenuadas



b. Inactivadas



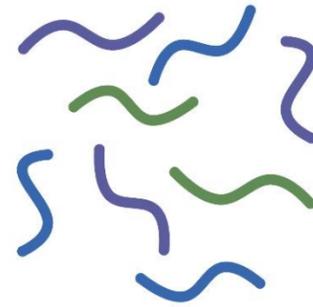
c. De subunidades



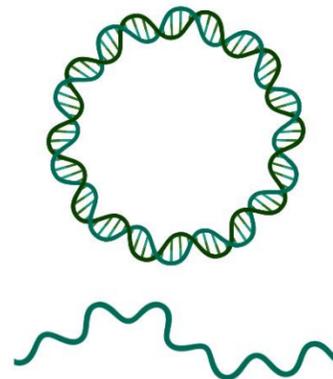
d. De toxoides



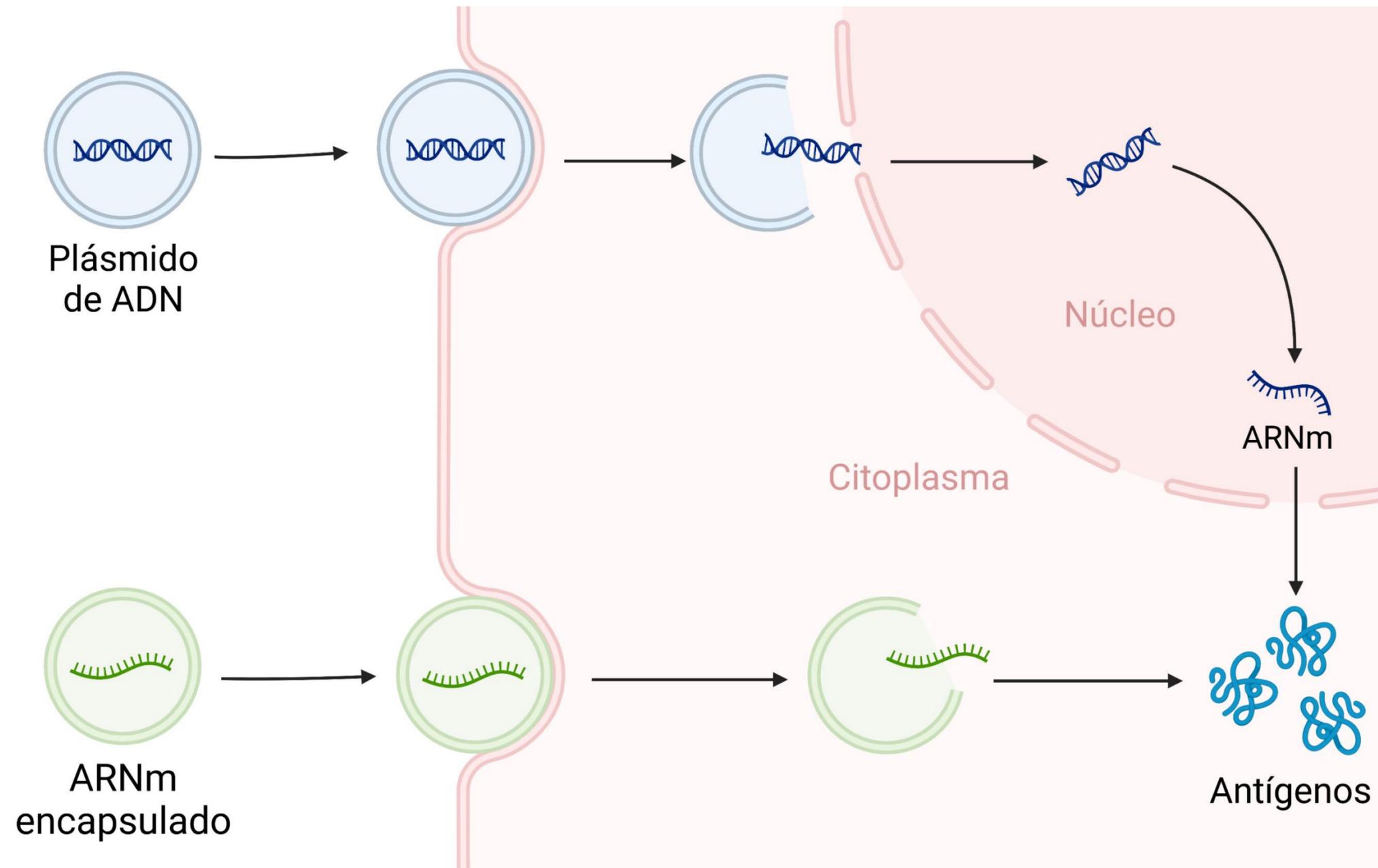
e. Recombinantes



f. ADN o ARN



Vacunas de ADN vs ARNm

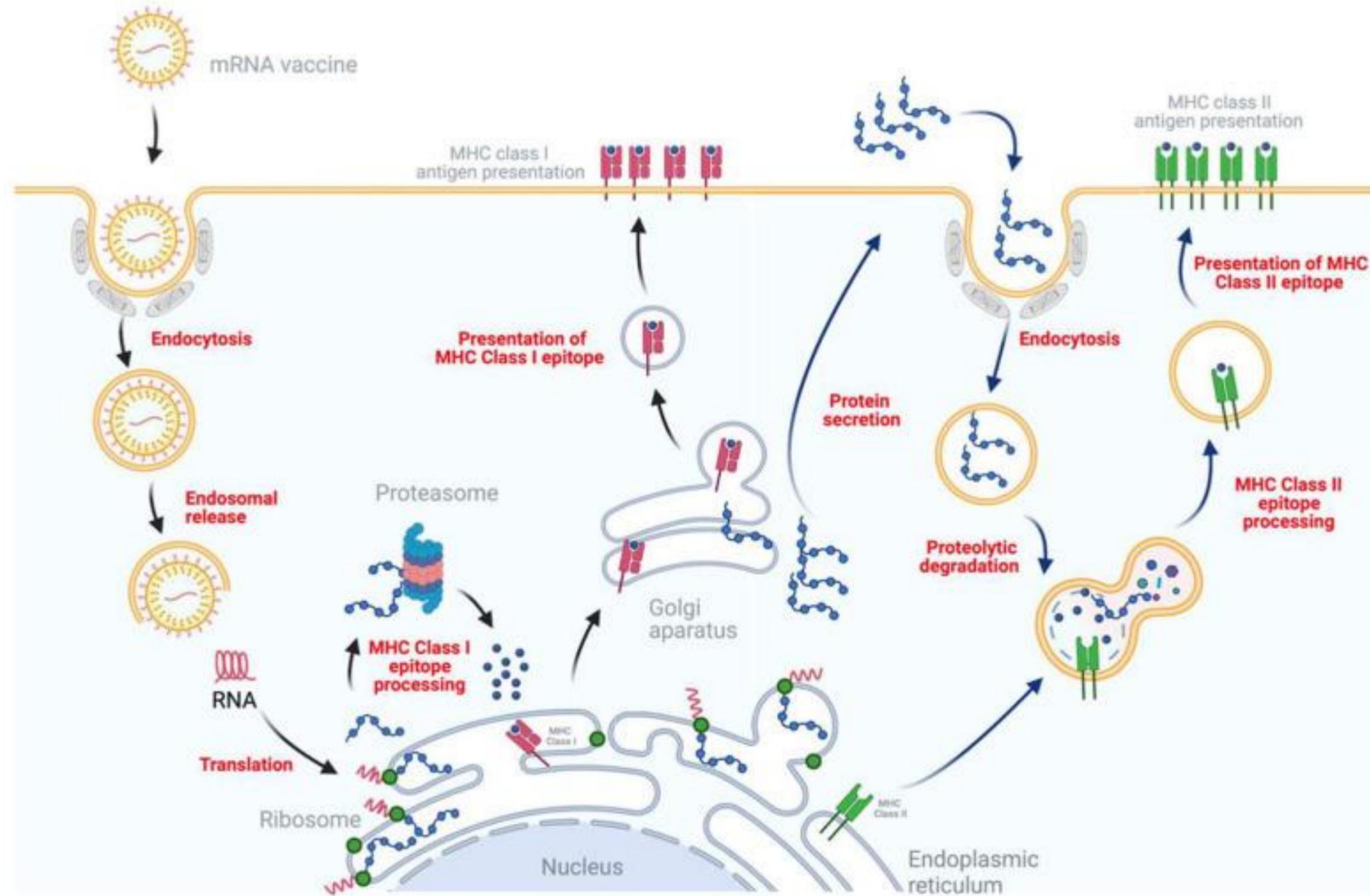


Por la pandemia de COVID-19 en 2021 se aprobó de emergencia las dos primeras vacunas de ARNm para humanos



Valor del mercado de las vacunas de ARNm: decenas de miles de millones de dólares

Vacunas de ARNm



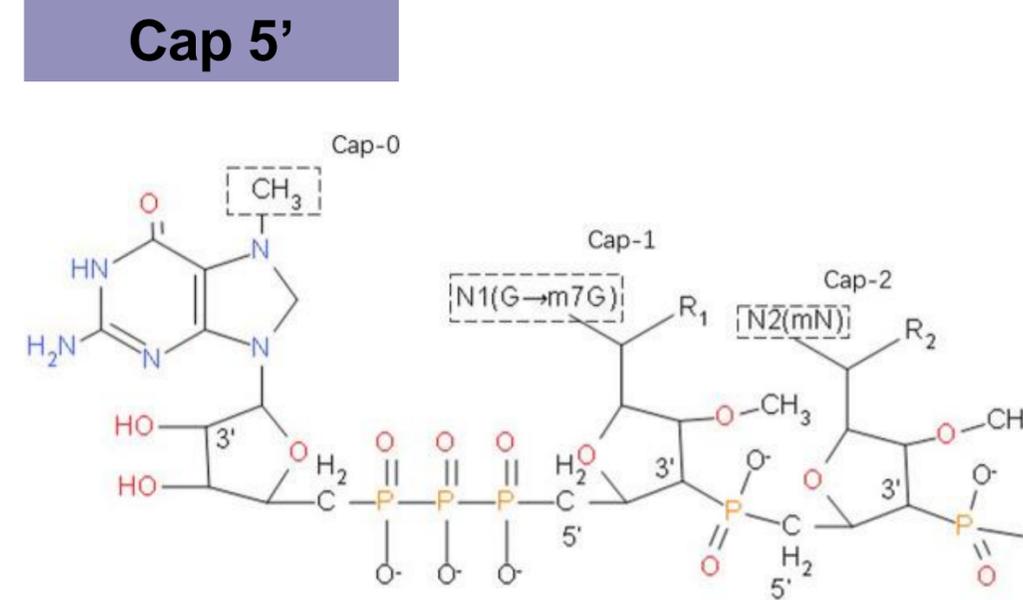
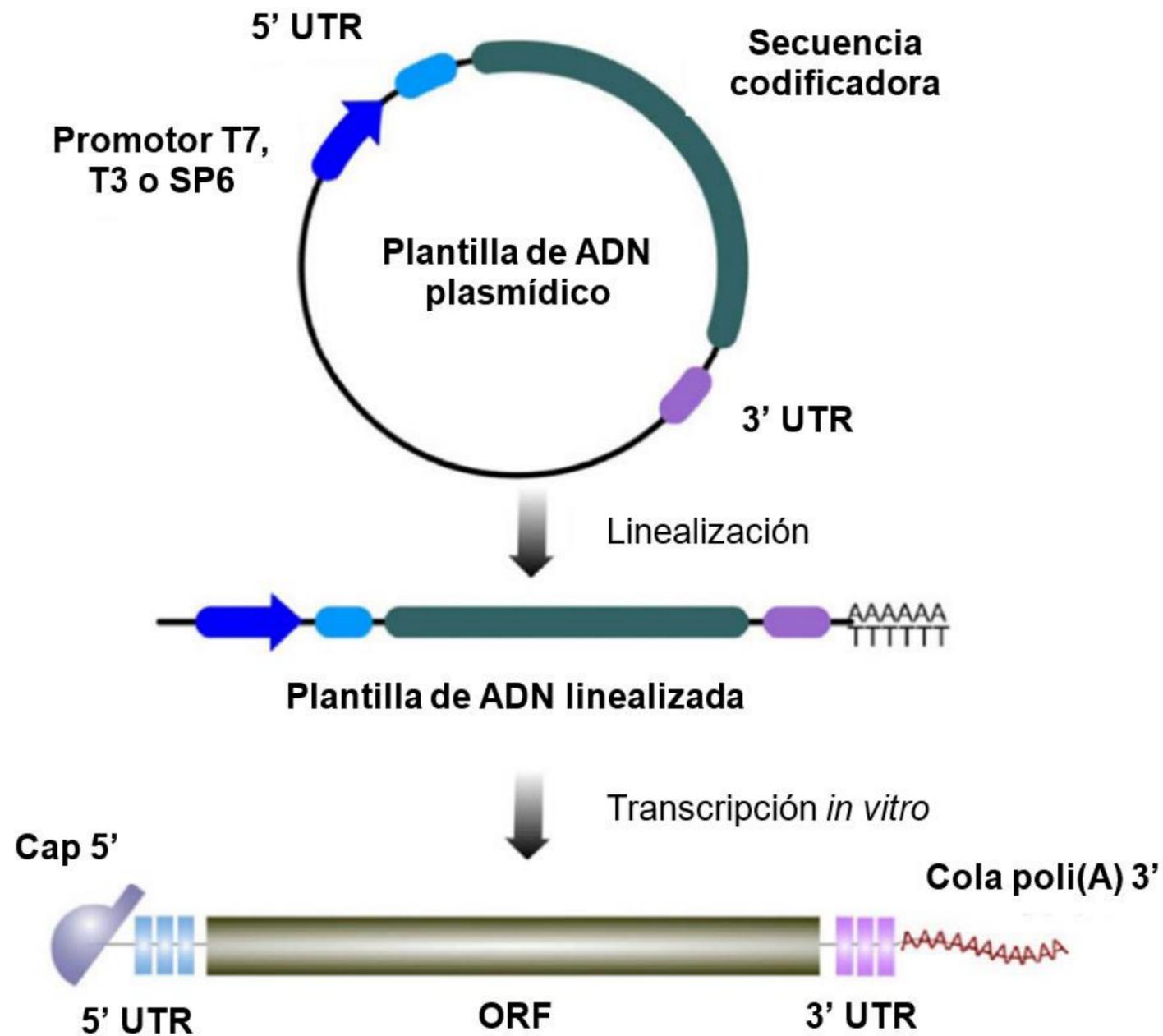
MHC I: se presentan los epítomos a los linfocitos T citotóxicos CD8⁺

Eliminan células infectadas

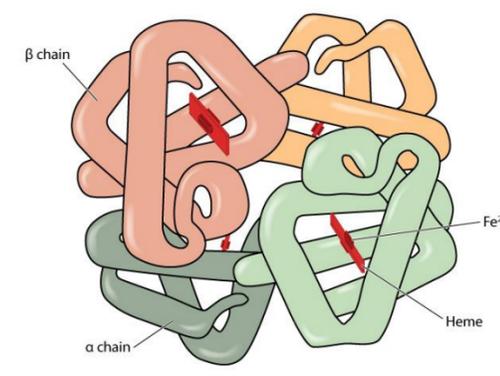
MHC II: se presentan los epítomos a los linfocitos T cooperadores CD4⁺

Promueven la actividad de CD8⁺ e interactúan con los linfocitos B para producir anticuerpos

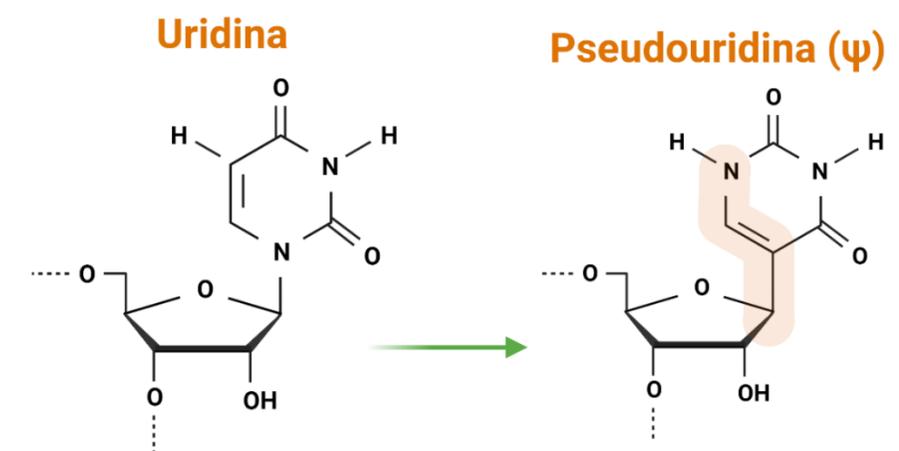
Vacunas de ARNm – Transcripción *in vitro*



UTR



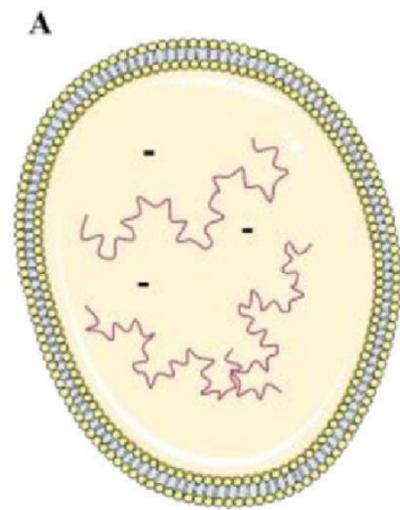
ORF



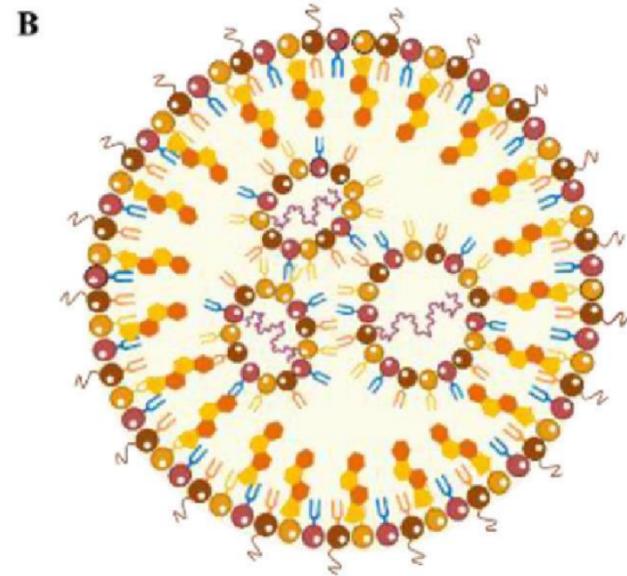
Cola poli(A)



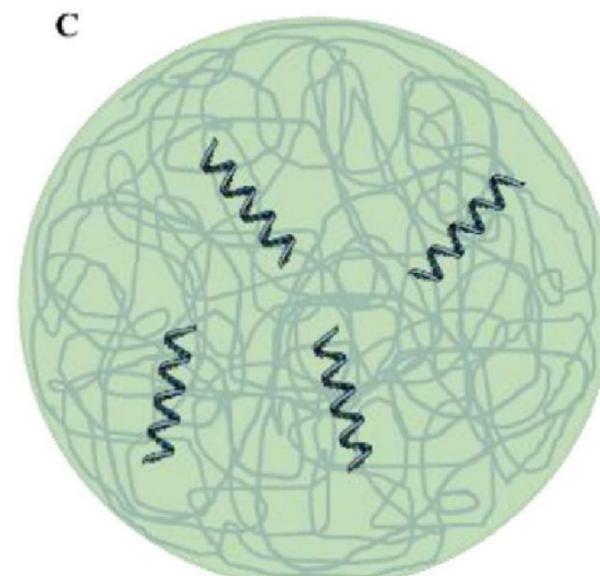
Vacunas de ARNm – Sistemas de administración



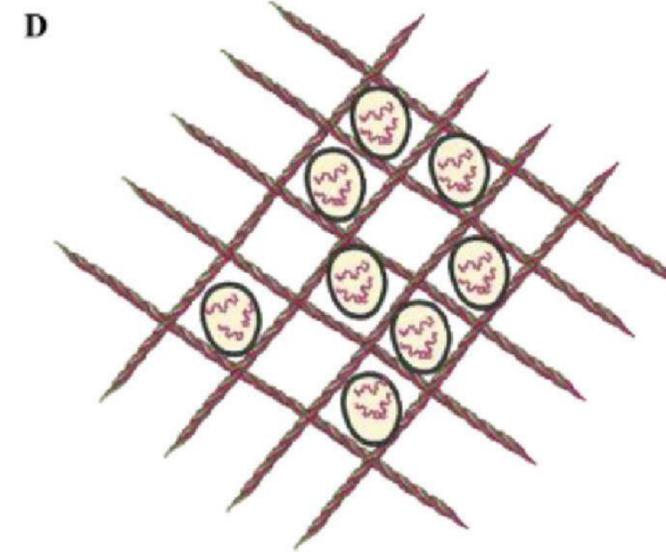
Liposome-entrapped IVT mRNA vaccine



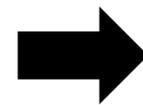
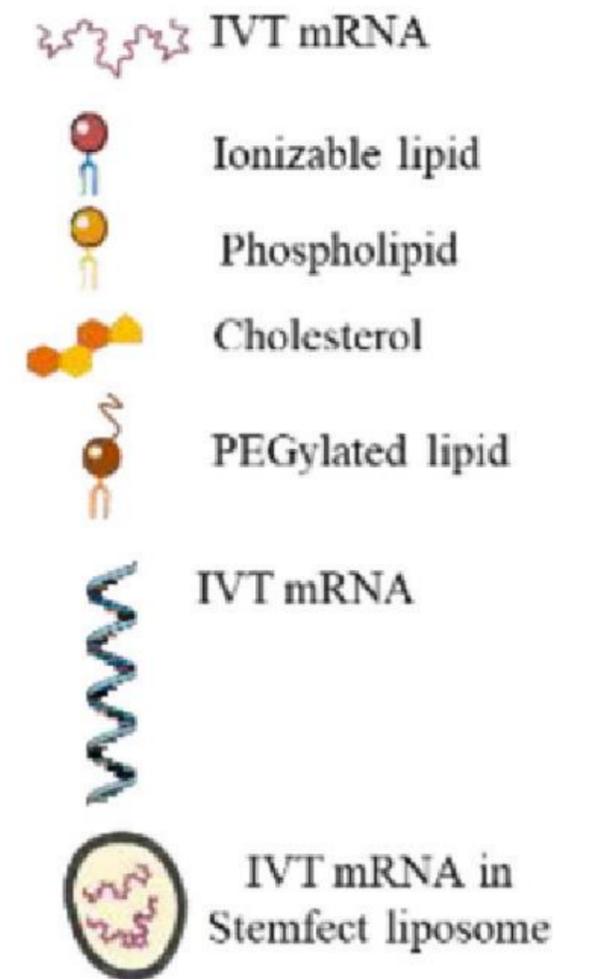
Lipid nanoparticle-entrapped IVT mRNA vaccine

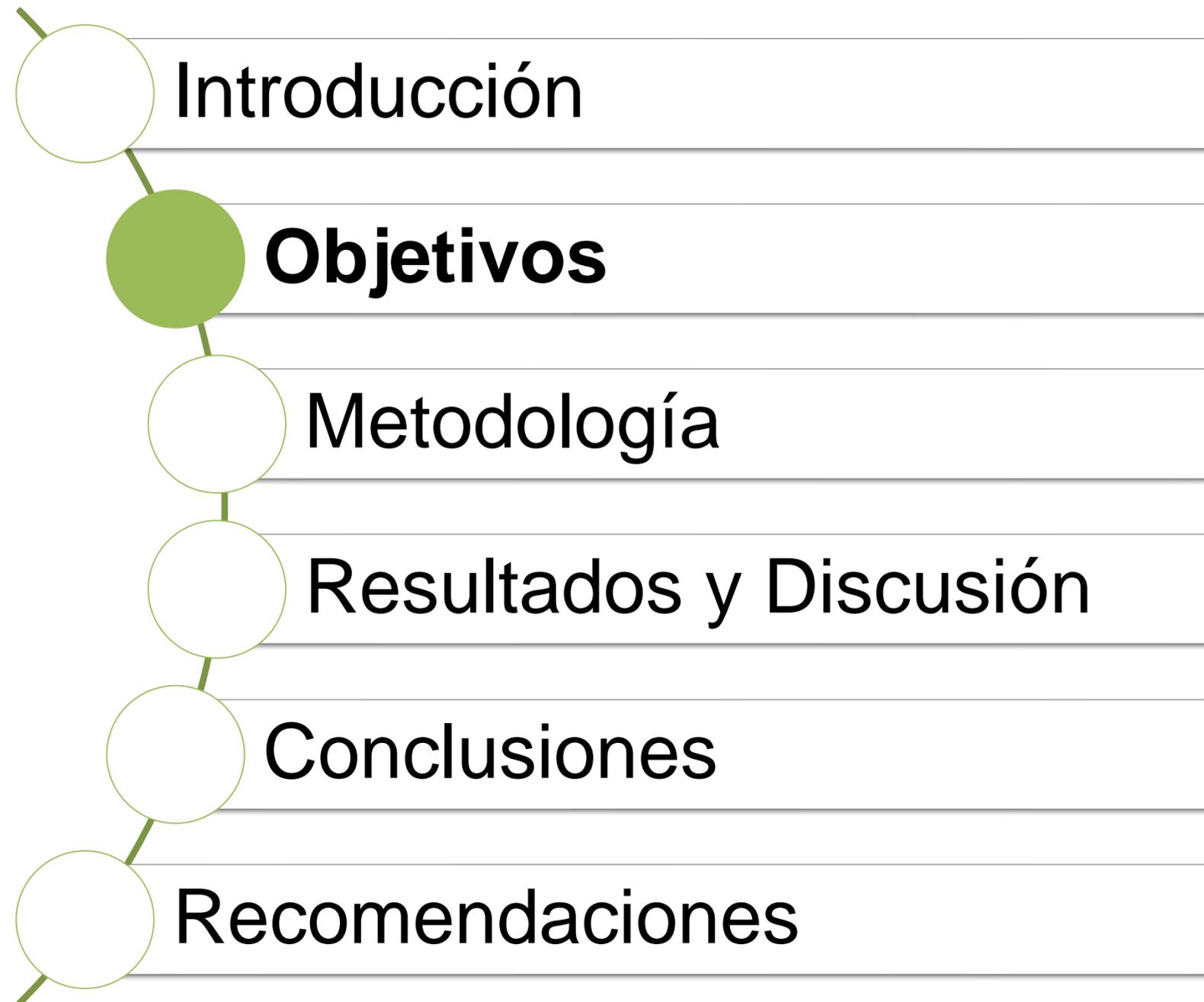


Polymeric nanoparticle-entrapped IVT mRNA vaccine



Scaffolds for delivery of IVT mRNA vaccine





General

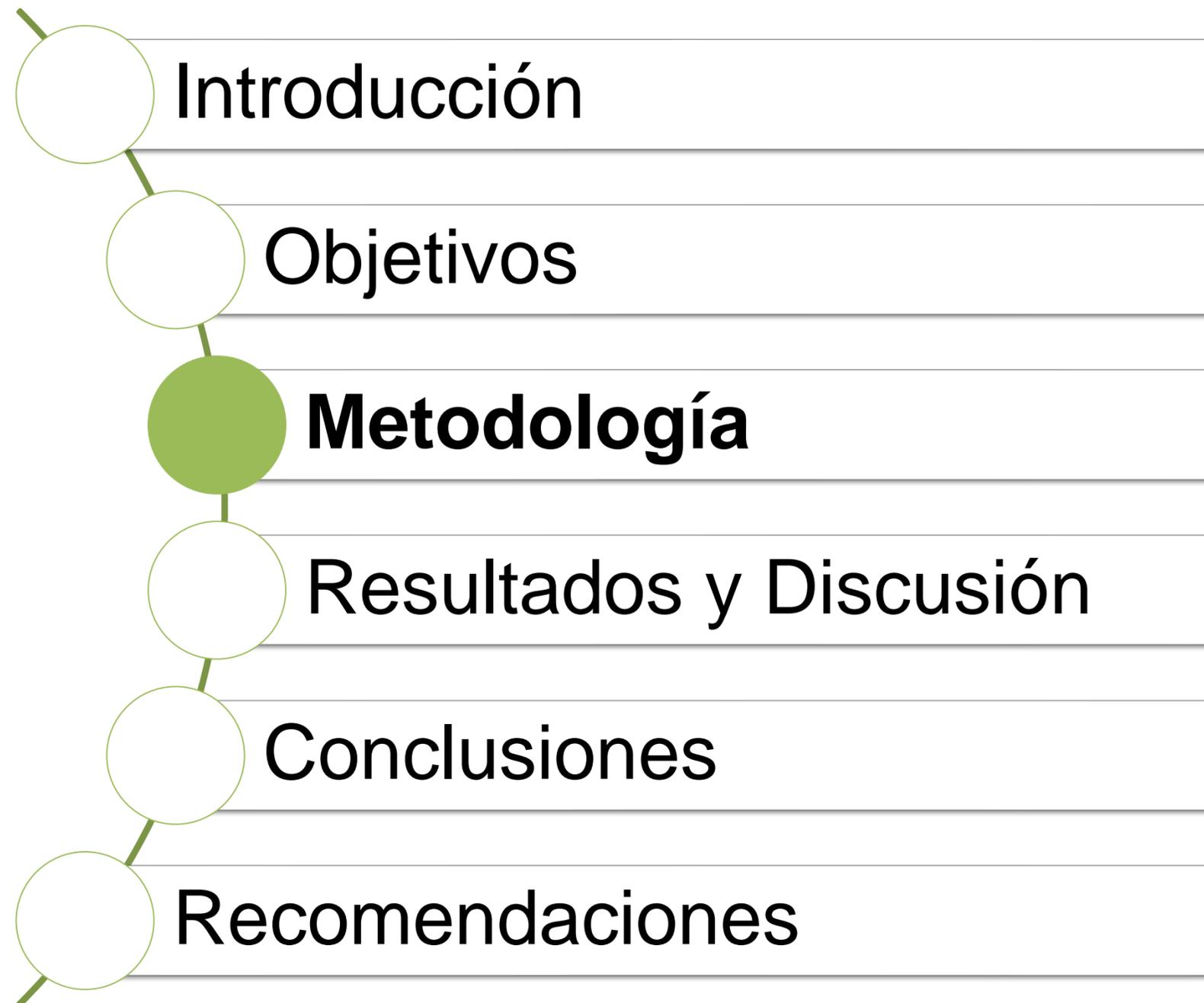
- Evaluar las bases moleculares para el diseño de vacunas de ARN con aplicación en veterinaria.

Específicos

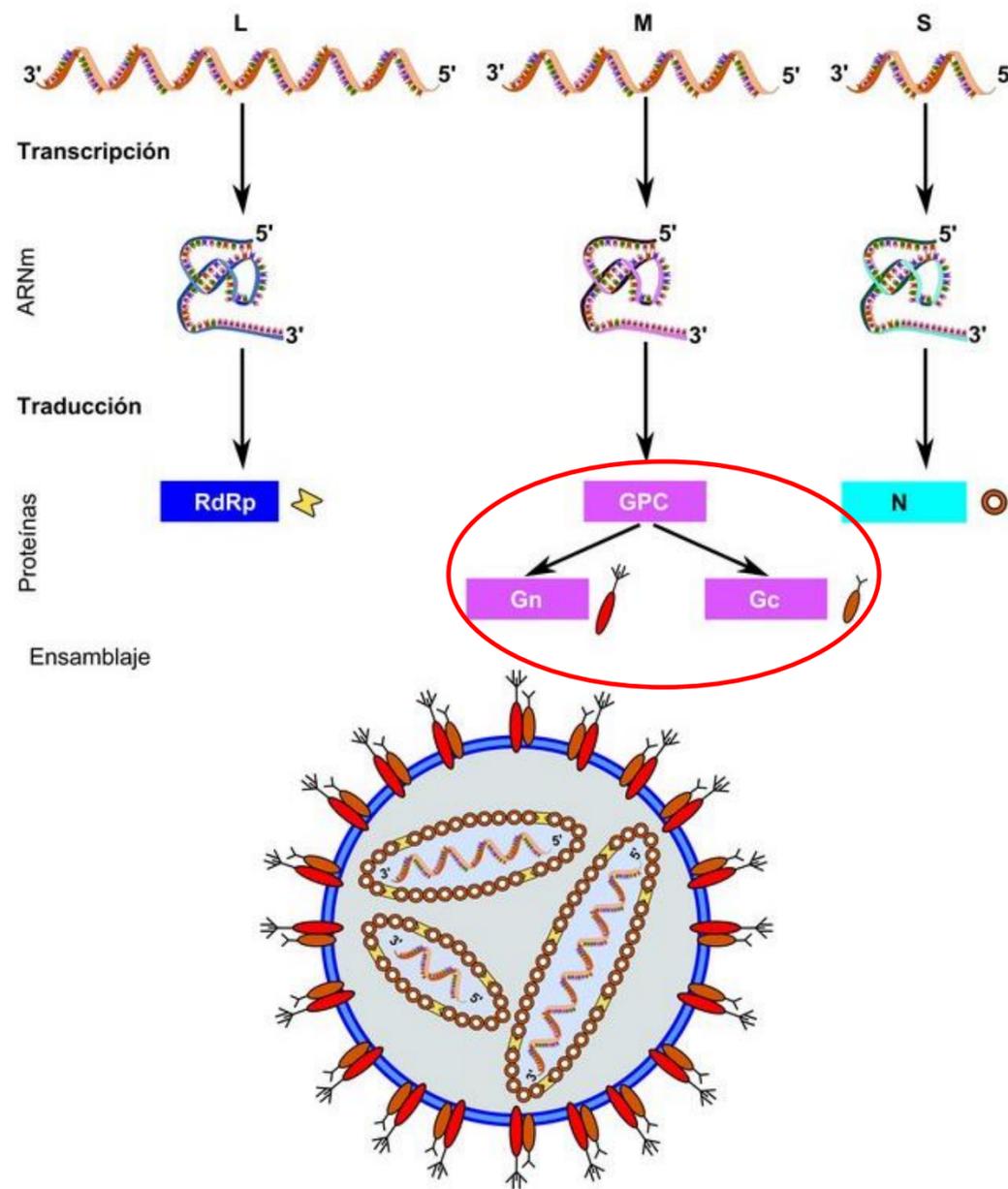
- Definir la secuencia para la expresión del ARN mensajero mediante herramientas bioinformáticas.
- Estandarizar las condiciones de la transcripción *in vitro* del ARN mensajero.
- Expresar el antígeno a través de la transfección del ARN mensajero en las líneas celulares HEK293 y HCT116.

Hipótesis

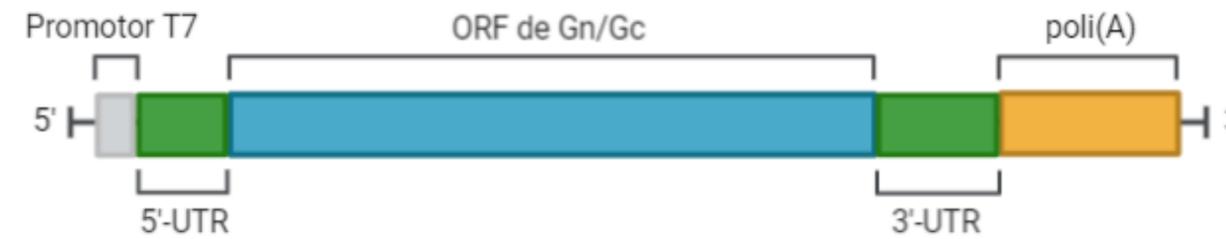
La transfección con el ARN mensajero permite la expresión del antígeno que codifica en las líneas celulares HEK293 y HCT116.



Definición de la secuencia para la expresión del ARNm



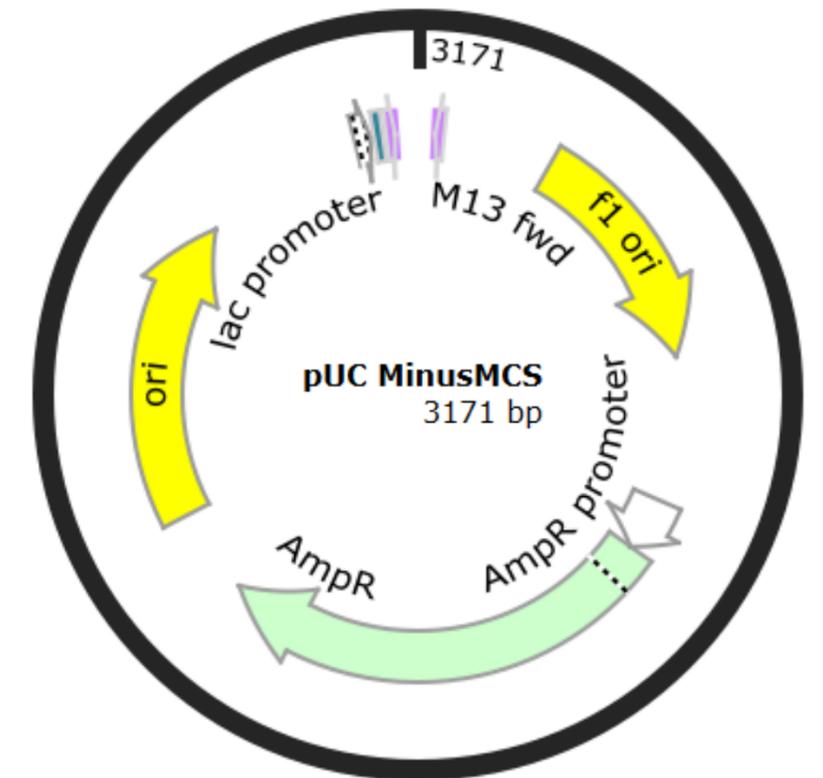
Hantavirus cepa Andes



Estructura de la unidad transcripcional

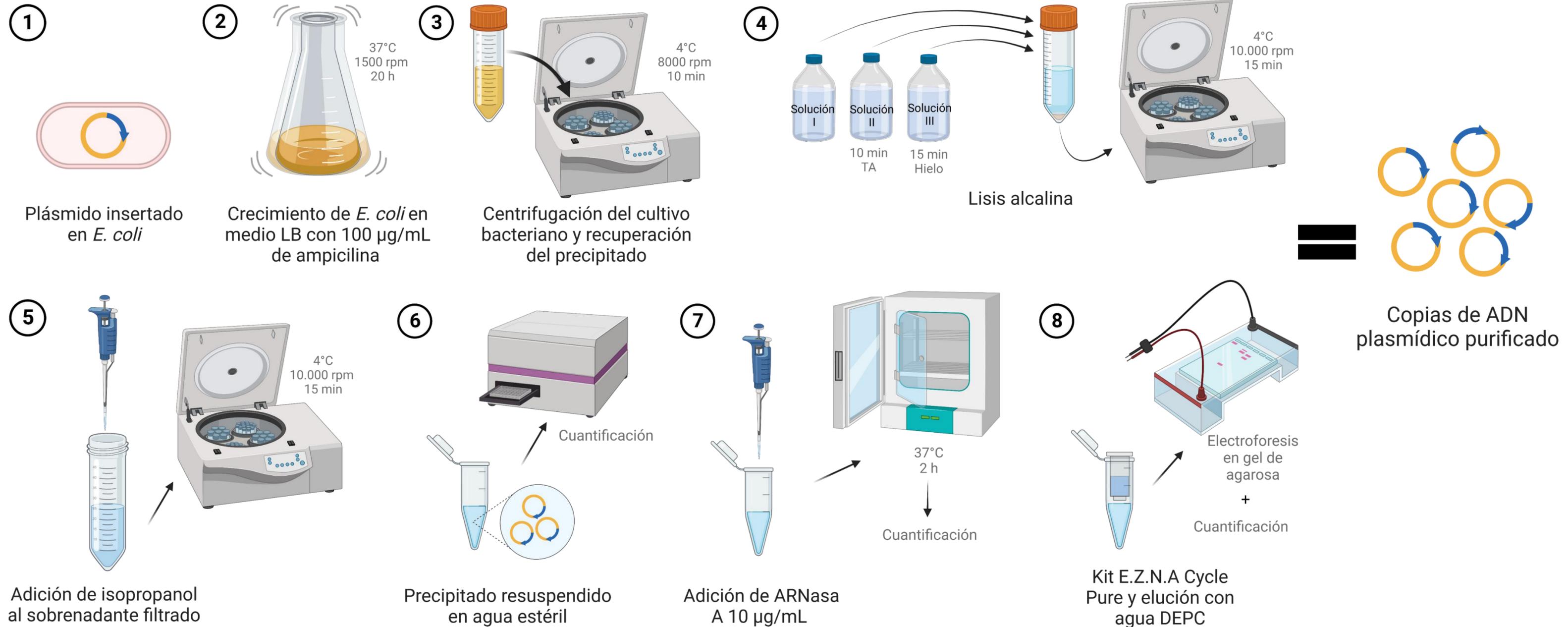


SnapGene
by Dotmatics



Clonación en el vector Blue Heron pUC MinusMCS

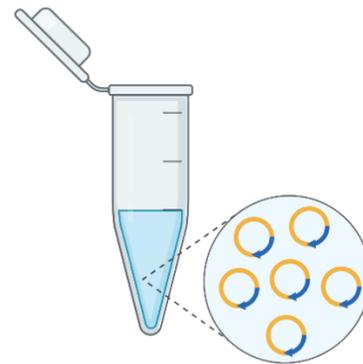
Amplificación y purificación del plásmido pUC MinusMCS – GnGc



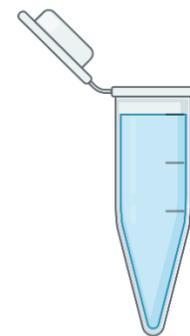
Digestión enzimática para verificar la identidad de pUC MinusMCS – GnGc

Con tres enzimas de restricción de alta fidelidad, EcoRV, SacI y KpnI

① ADN plasmídico purificado



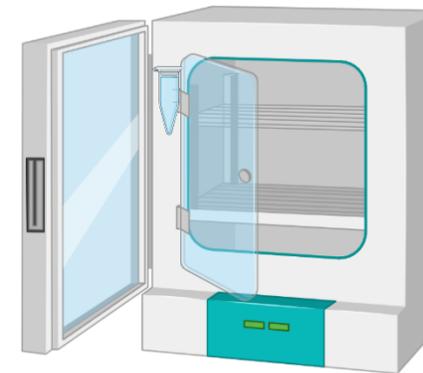
② Adición de enzima, buffer y agua



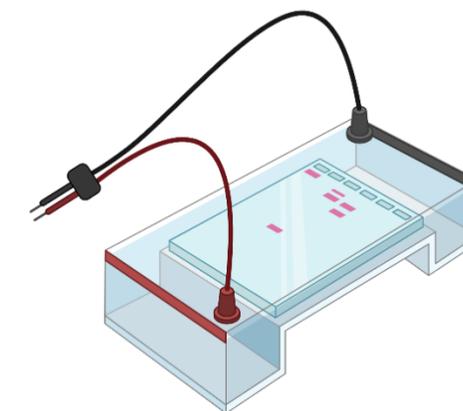
-EcoRV,
-SacI, KpnI

-CutSmart

③ Incubación a 37°C por 3 h

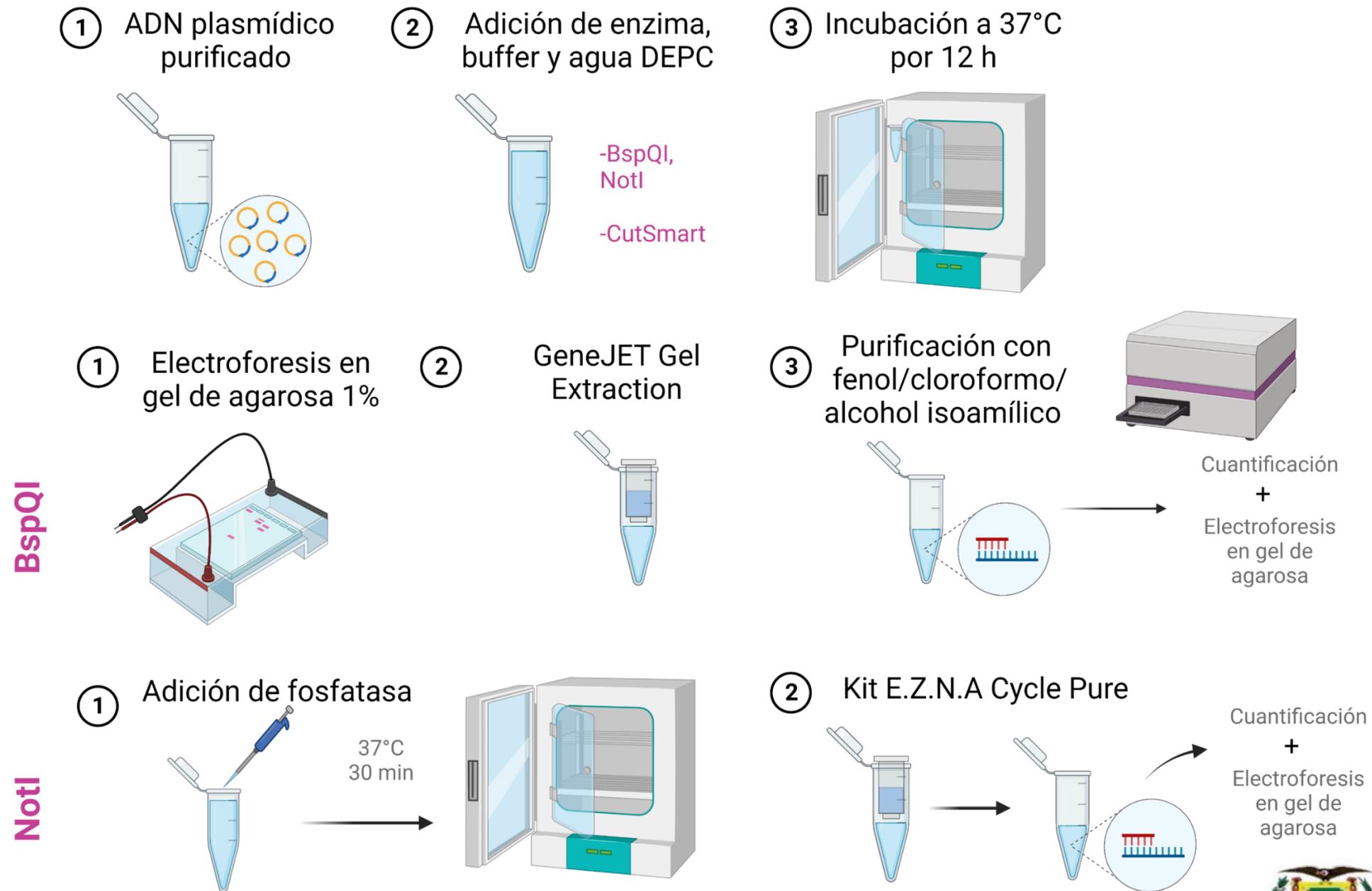


④ Electroforesis en gel de agarosa 1%

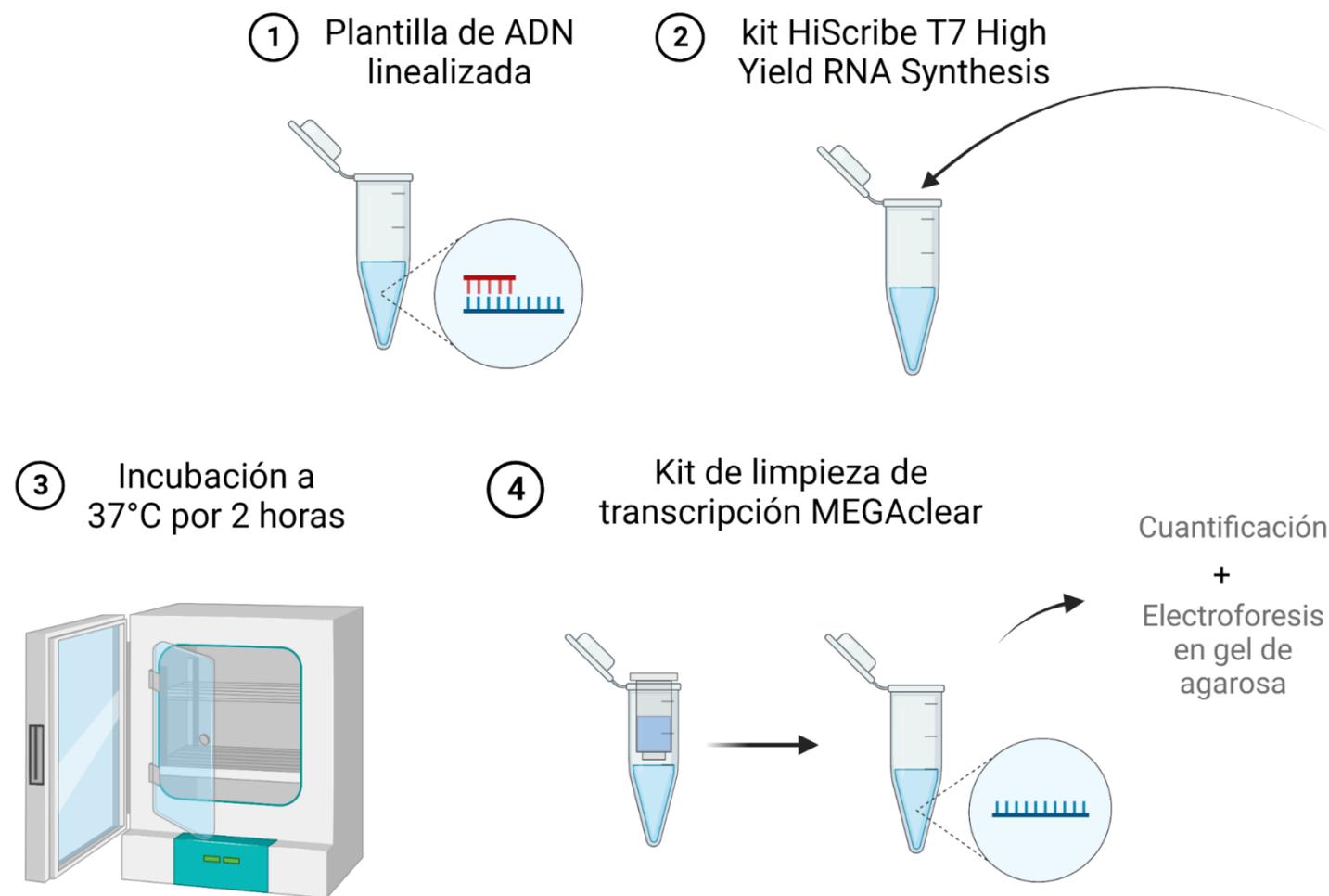


Linealización de pUC MinusMCS – GnGc

Con dos enzimas de restricción de alta fidelidad, BspQI y NotI



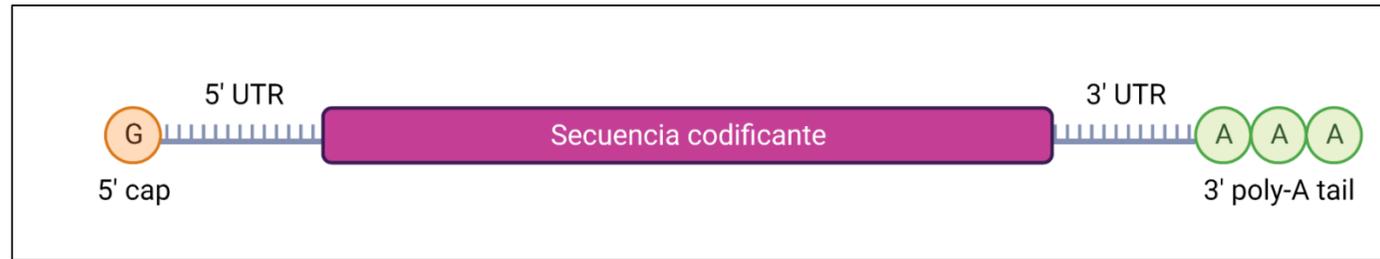
Estandarización de la transcripción *in vitro* del ARNm



Componentes de la reacción de transcripción *in vitro*

Componente	Cantidad	Concentración final
Agua DEPC	X μ L	
Buffer de reacción 10X	2 μ L	1X
ATP (100 mM)	2 μ L	10 mM
GTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
UTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
CTP (100 mM)	2 μ L	10 mM
Plantilla de ADN	X μ L	1 μ g
Polimerasa T7 ARN	2 μ L	
Volumen total de la reacción	20 μL	

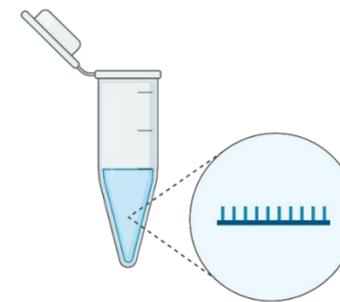
Estandarización de la transcripción *in vitro* del ARNm



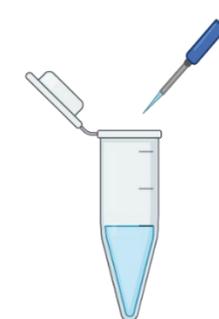
Componentes de la reacción de capping enzimático

Componente	Cantidad (x5)
ARNm sin cap	70 μ L
Buffer de capping 10X	10 μ L
GTP (10 mM)	5 μ L
SAM (4 mM)	5 μ L
Enzima Vaccinia Capping (10 U/ μ L)	5 μ L
ARNm Cap 2'-O- metiltransferasa (50 U/ μ L)	5 μ L
Volumen total de la reacción	100 μL

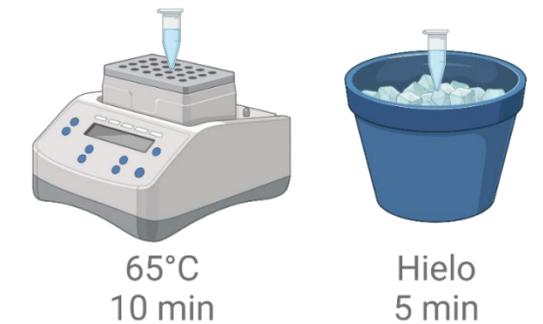
① ARNm purificado sin cap 5'



② Adición de inhibidor de ARNasa RiboLock



③ Calentar e incubar en hielo



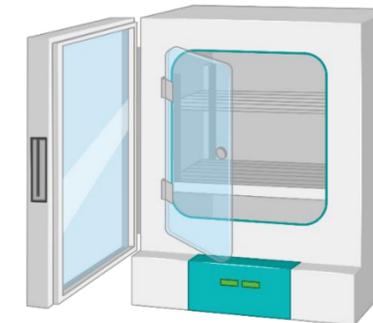
65°C
10 min

Hielo
5 min

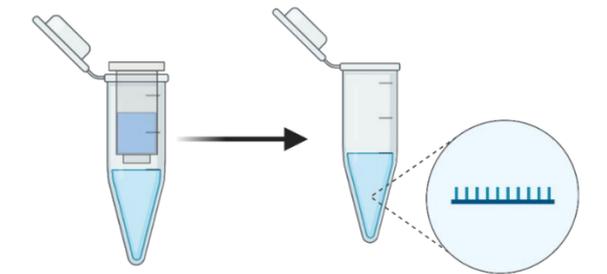
④ Kit Vaccinia Capping System



⑤ Incubación a 37°C por 1 hora



⑥ Kit de limpieza de transcripción MEGAclean



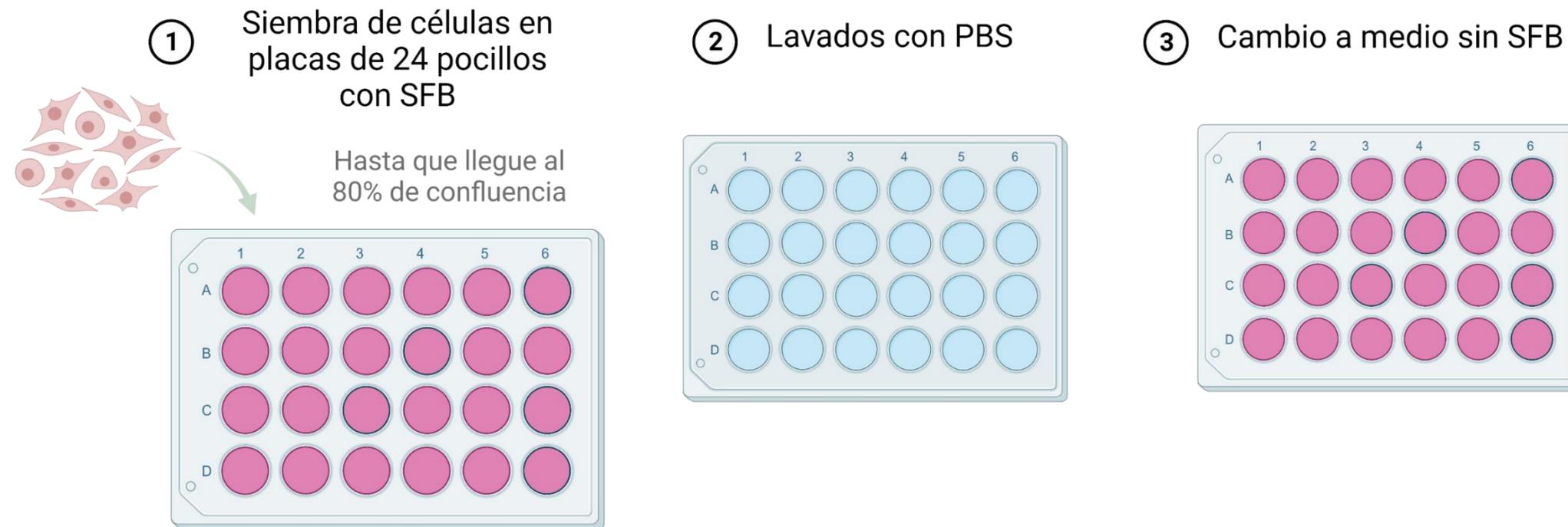
Cuantificación

+

Electroforesis en gel de agarosa

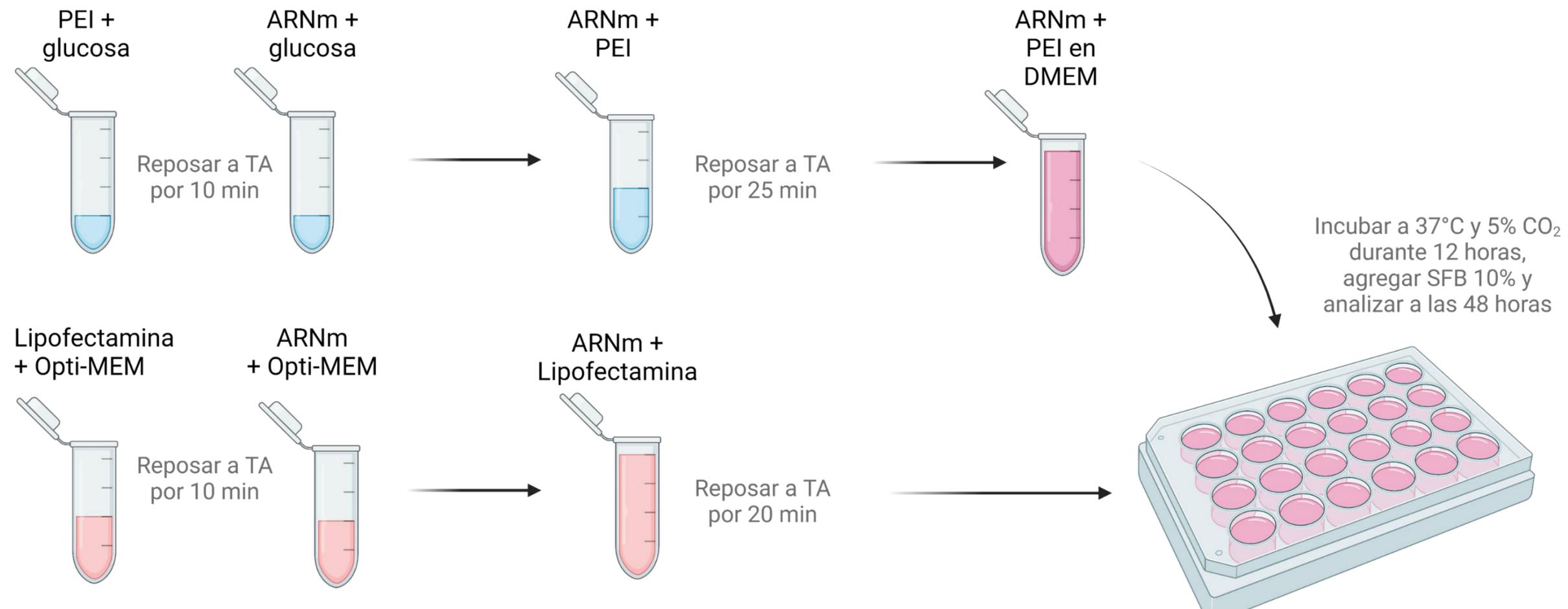
Transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116

HEK293A: células de riñón de embrión humano; HCT116: células de carcinoma colorrectal humano

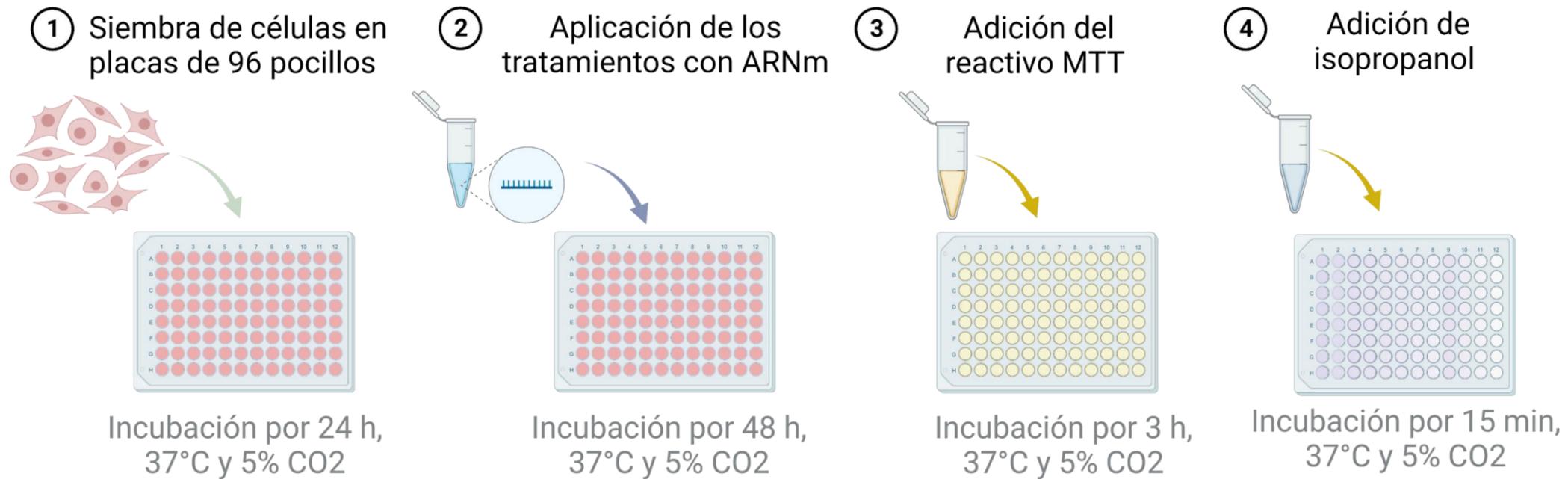


Transfección del ARNm en las líneas celulares HEK293A y HCT116

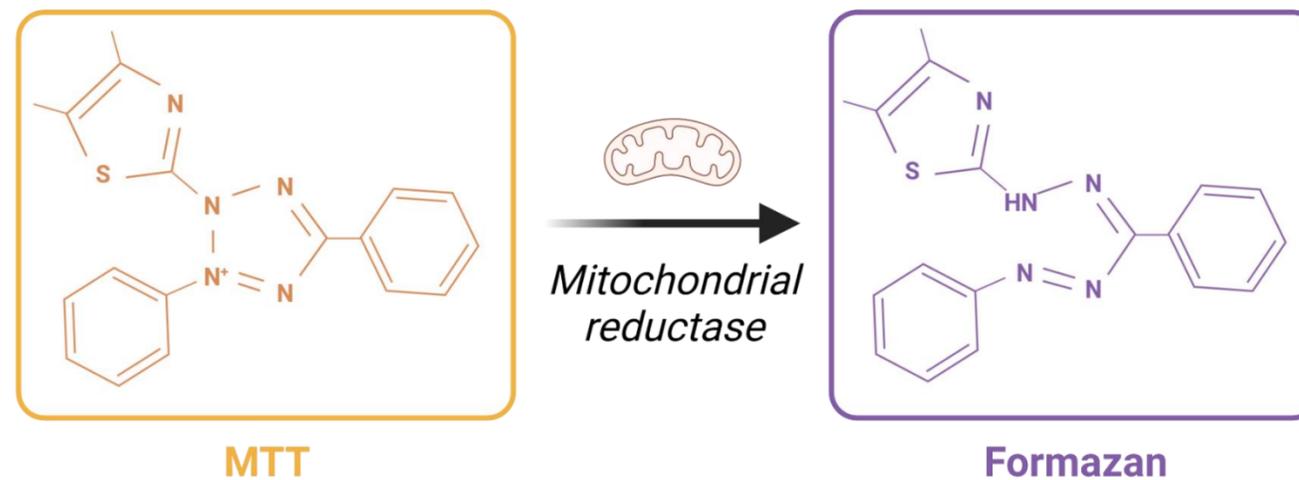
HEK293A: células de riñón de embrión humano; HCT116: células de carcinoma colorrectal humano



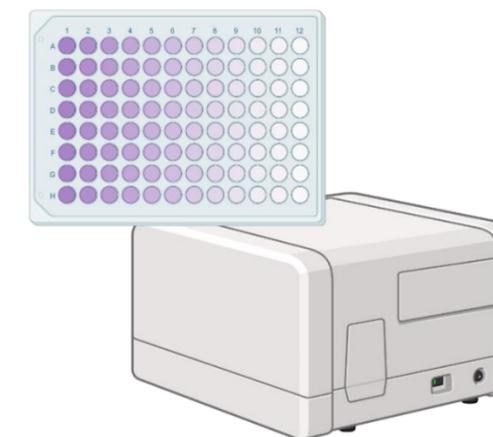
Evaluación de la viabilidad celular



⑤ Reacción colorimétrica para determinar la viabilidad celular



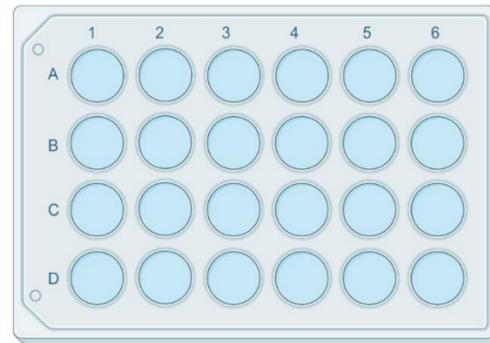
⑥ Lectura de absorbancia a 570 nm



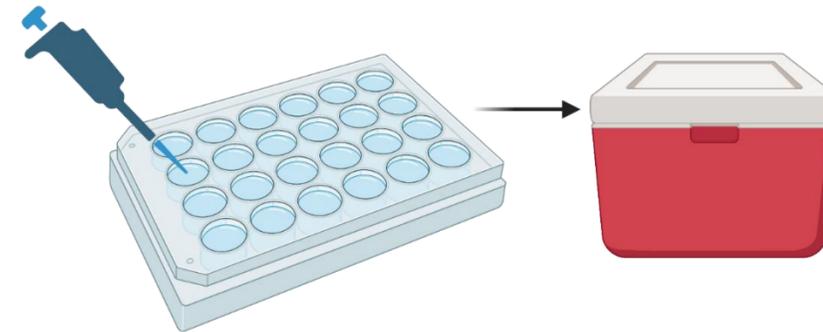
Análisis de la expresión del antígeno

Lisis celular

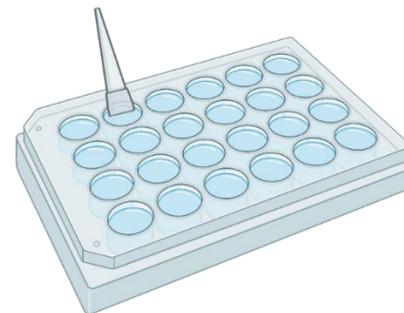
① Lavados de los pocillos con PBS



② Adicionar RIPA+PMSF e incubar en hielo por 5 minutos



③ Raspar los pocillos

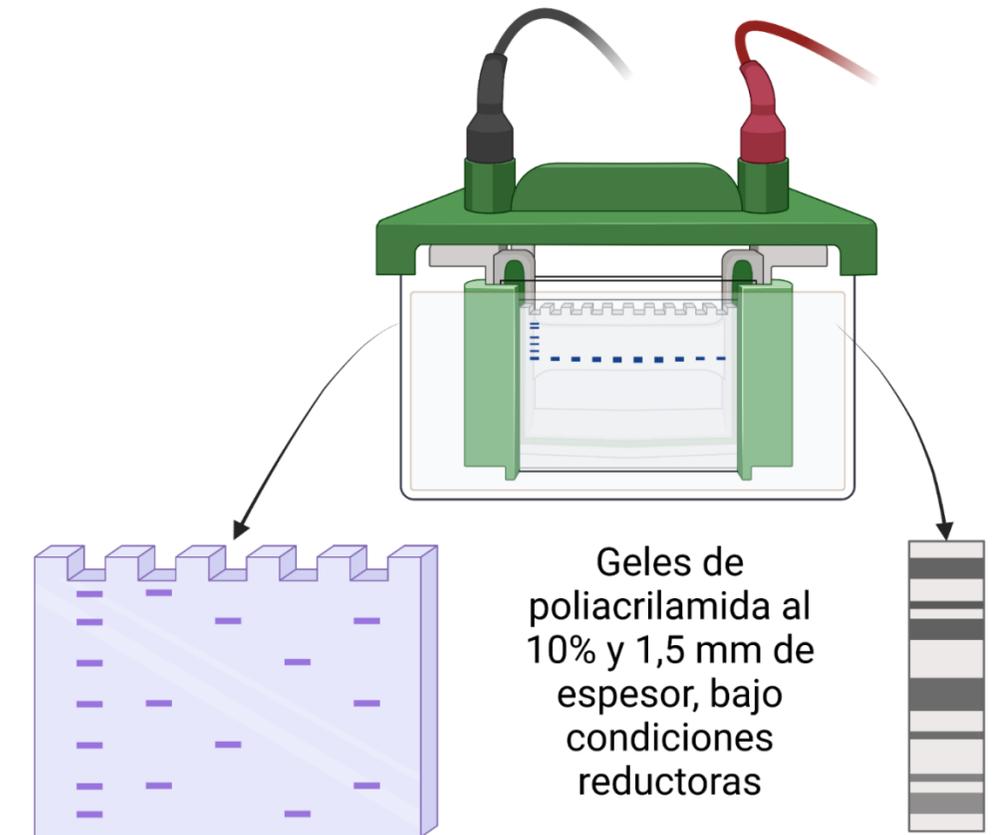


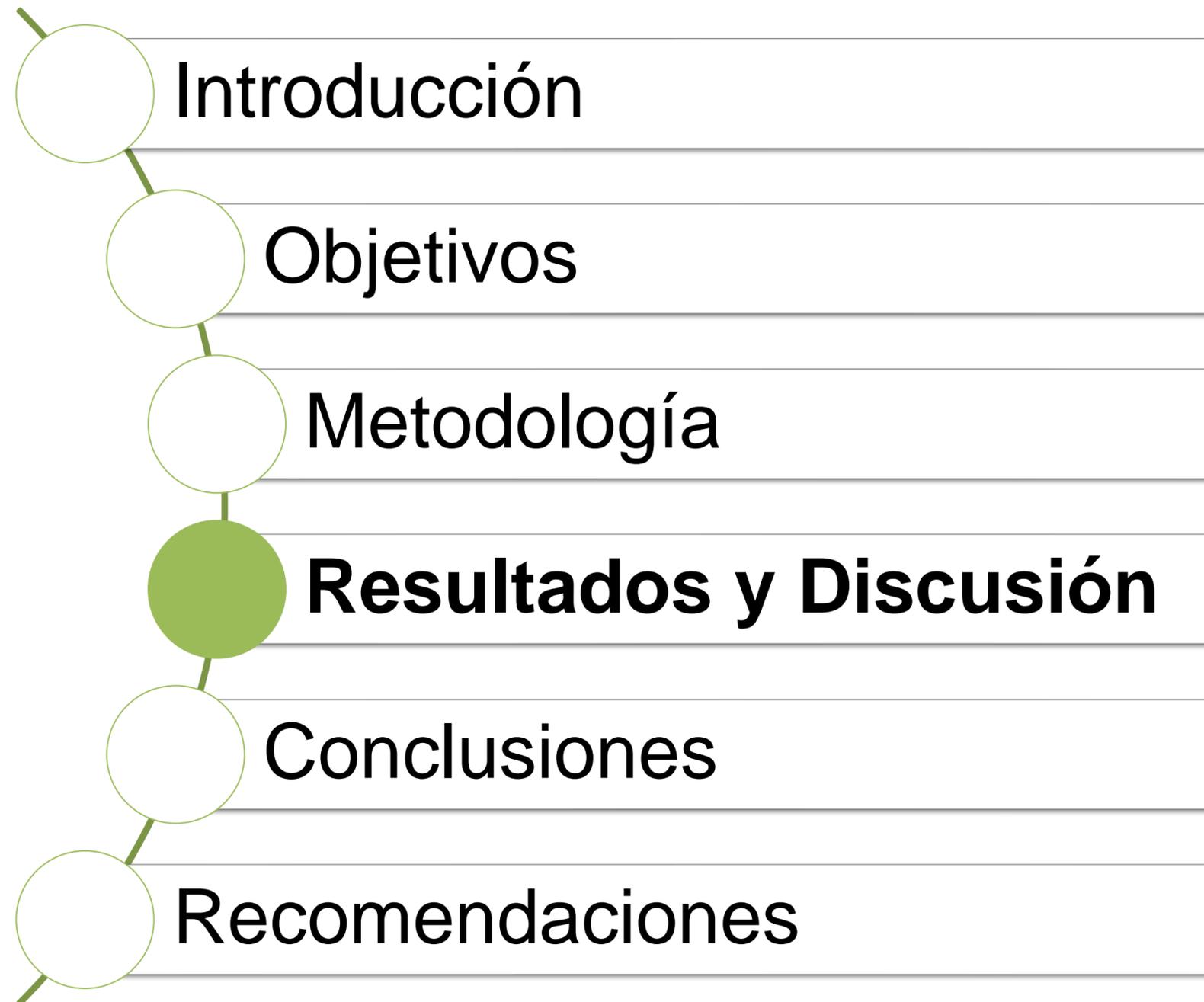
④ Centrifugación para recuperar el sobrenadante



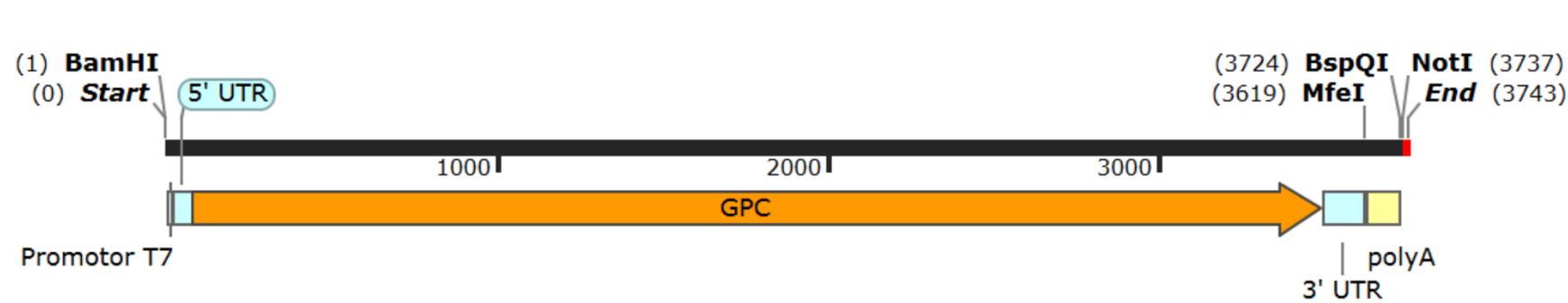
10.000 x g
4°C
15 min

Análisis SDS-Page y Western Blot





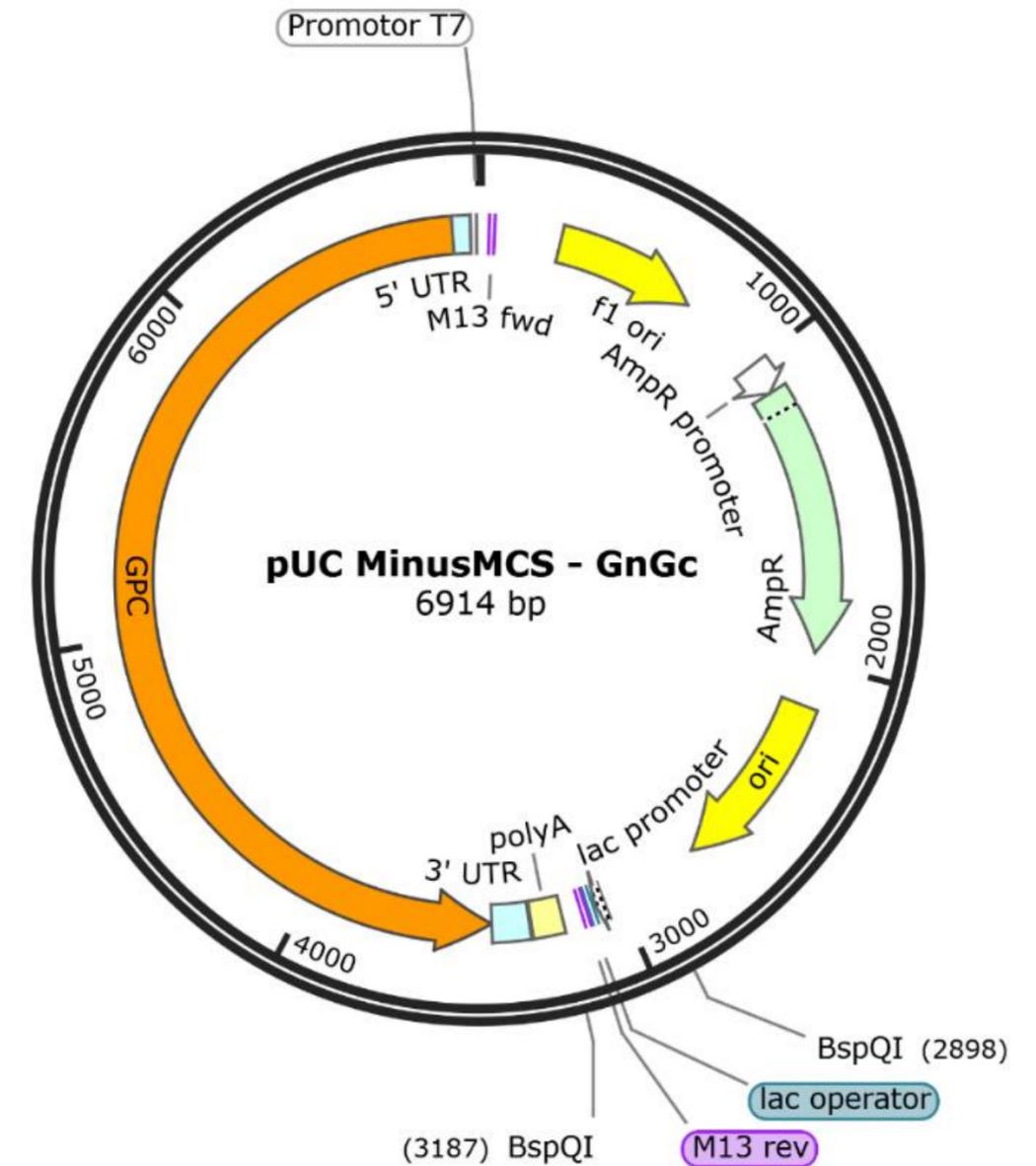
Definición de la secuencia para la expresión del ARNm



GPC
3743 bp

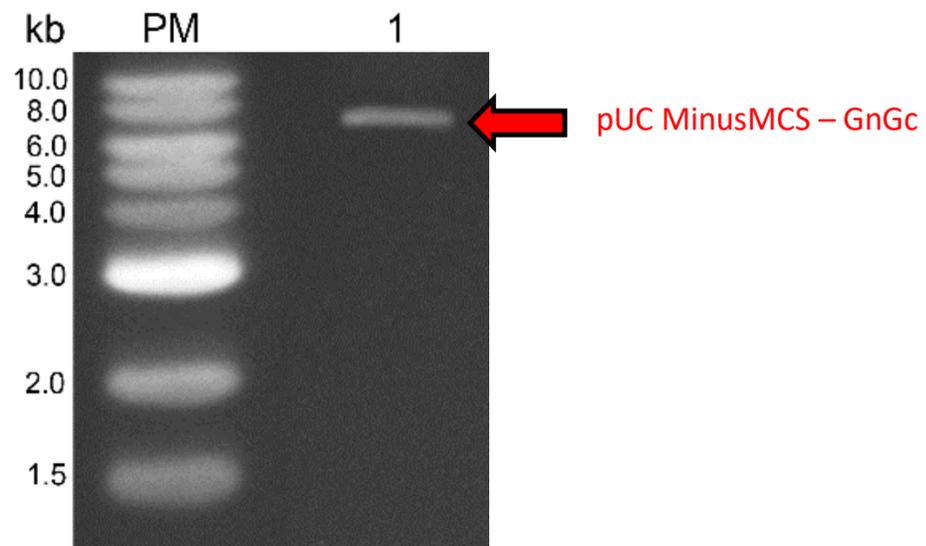
Dominio	Secuencia	Tamaño (pb)
Promotor T7	TAATACGACTCACTATAGG	19
5' UTR	GGGAAATAAGAGAGAAAAGAAGAGTAAGAAGAAATATAAGACCC CGGCGCCGCCACC	57
GPC	ATGGA...GTGA	3417
3' UTR	TGATAATAGGCTGGAGCCTCGGTGGCCTAGCTTCTTGCCCCTTG GGCCTCCCCCAGCCCCTCCTCCCCTTCTGCACCCGTACCCC CGTGGTCTTTGAATAAAGTCTGAGTGGGCGGC	119
Cola poli(A)	AA AA AAAAAAAAA	100

Nota. Codón de inicio en verde, codón de parada en rojo y secuencia Kozak en negrita.



Purificación de pUC MinusMCS – GnGc

*Electroforesis en gel de agarosa al 1%,
purificación del plásmido pUC MinusMCS – GnGc*



Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb;
1, plásmido purificado (flecha roja).

Concentración del plásmido:

Tras la lisis alcalina: 1,95 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

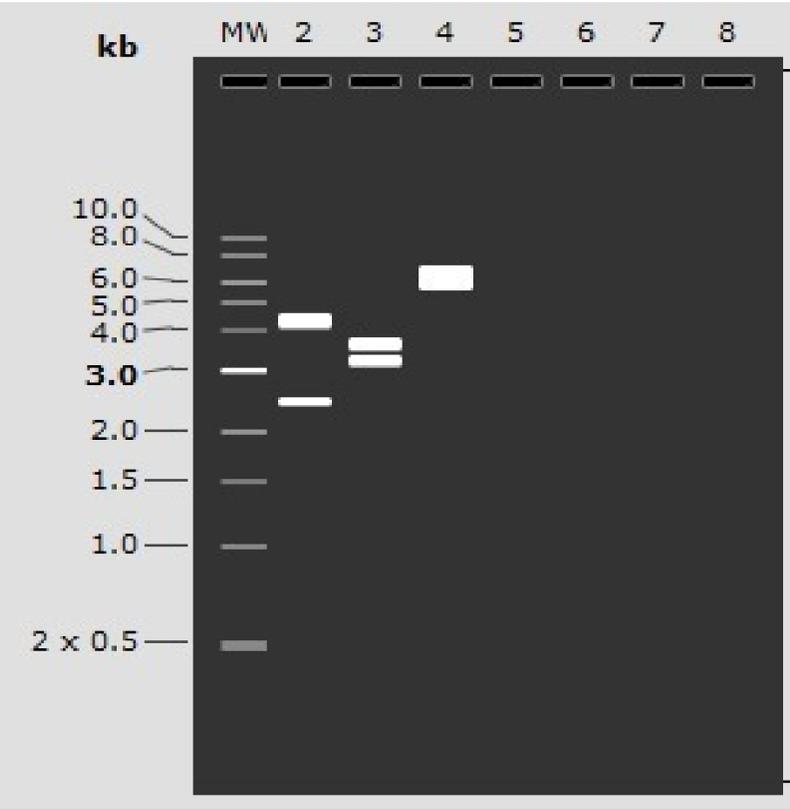
Tras añadir ARNasa A: 1,54 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Tras purificar con kit: 0,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Tamaño del plásmido:

6.9 kb

Digestión enzimática para verificar la identidad de pUC MinusMCS – GnGc



SacI + EcoRV:

- 1. 4460 pb
- 2. 2454 pb

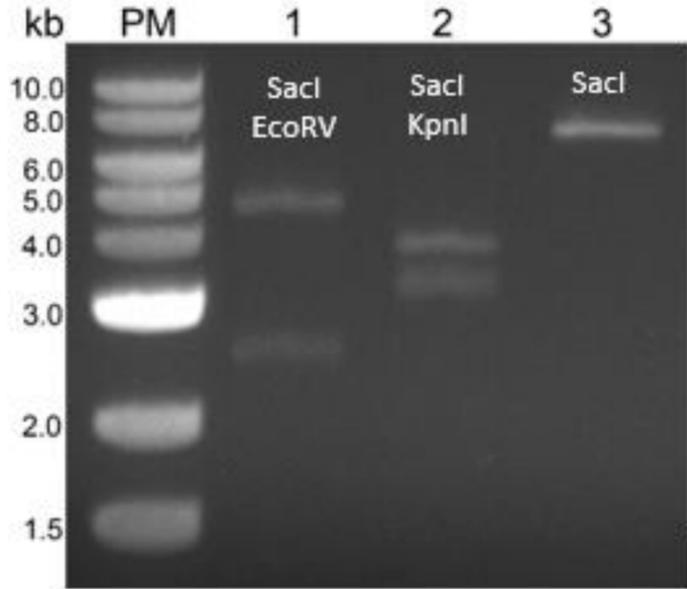
SacI + KpnI

- 1. 3677 pb
- 2. 3237 bp

SacI

- 1. 6914 pb

*Electroforesis en gel de agarosa al 1%,
digestión enzimática de pUC MinusMCS – GnGc*



Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb;

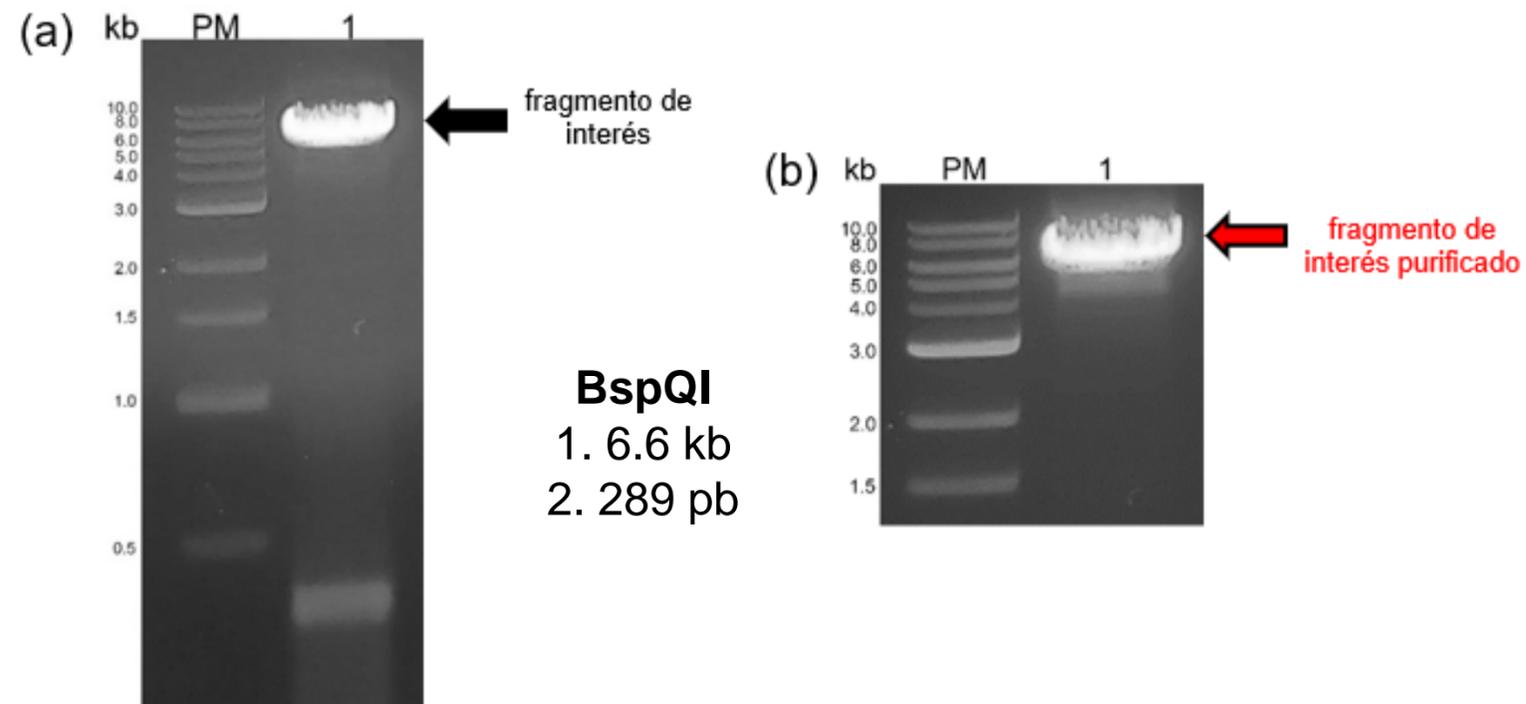
1, digestión del plásmido con SacI y EcoRV;

2, digestión del plásmido con SacI y KpnI;

3, digestión del plásmido con SacI.

Linealización de pUC MinusMCS – GnGc

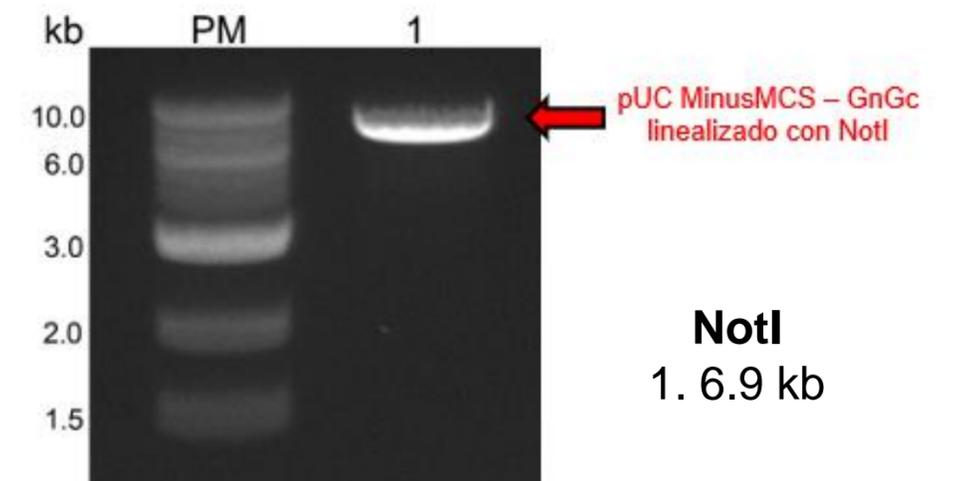
Electroforesis en gel de agarosa al 1%,
linealización de pUC MinusMCS – GnGc con BspQI



Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb;

(a) 1, plásmido cortado con BspQI donde se observa el fragmento de interés (flecha negra); (b) 1, fragmento de interés purificado después de la linealización del plásmido con BspQI (flecha roja).

Electroforesis en gel de agarosa al 1%,
linealización de pUC MinusMCS – GnGc con NotI



Carriles: PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb;
1, plásmido linealizado con NotI (flecha roja).

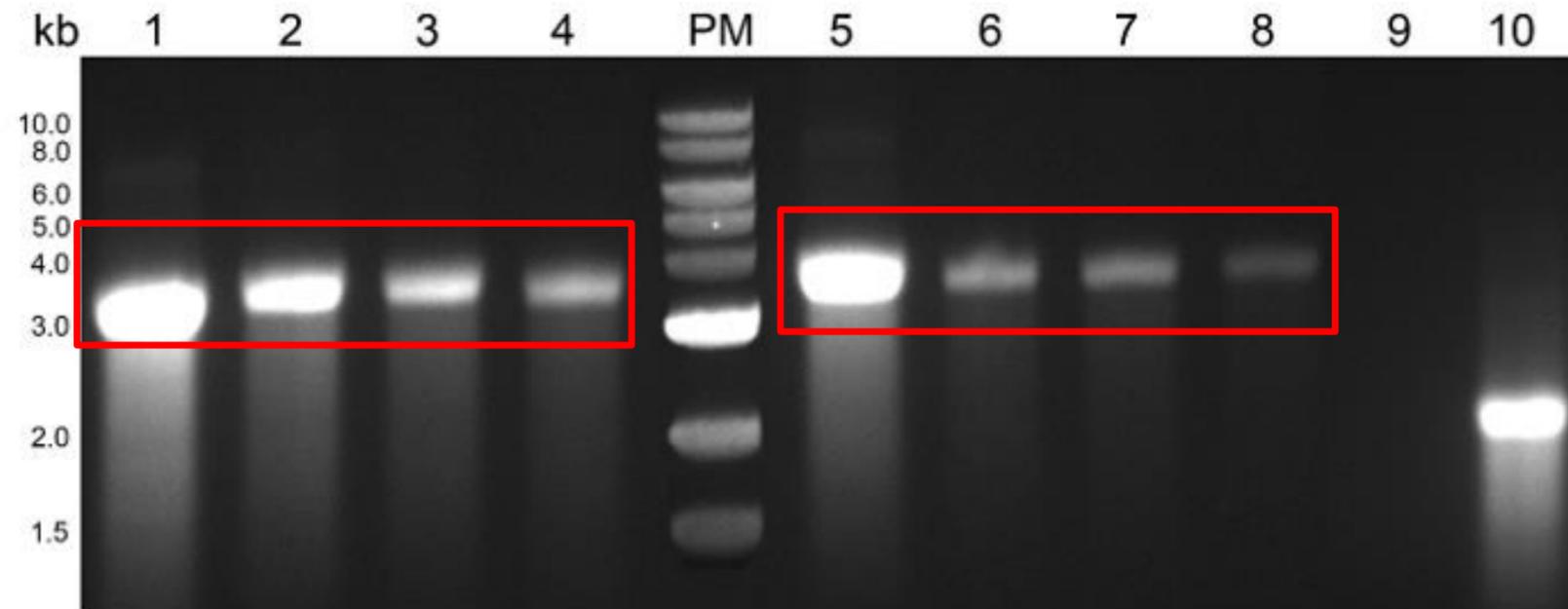
Concentración:

Plantilla linealizada con BspQI: 0,14 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Plantilla linealizada con NotI: 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Estandarización de la transcripción *in vitro* del ARNm

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ARNm transcrito *in vitro*

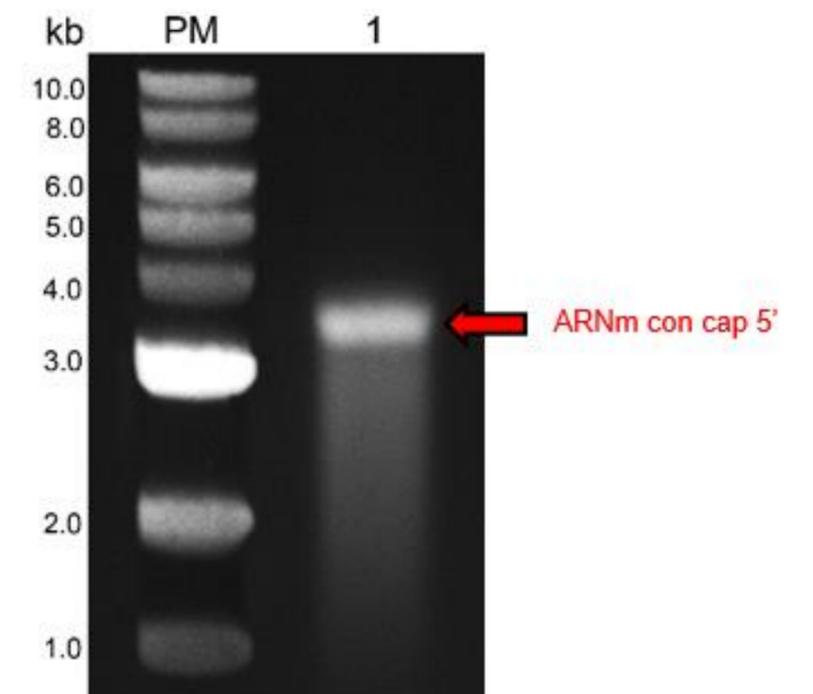


Carriles: 1, ARNm transcrito de la plantilla linealizada con BspQI; 2, 3 y 4, diluciones seriadas de 1; PM, marcador de peso molecular GeneRuler 1 kb; 5, ARNm transcrito de la plantilla linealizada con NotI; 6, 7 y 8, diluciones seriadas de 5; 9, control negativo (agua); 10, control positivo (FLuc). En todas las muestras de ARNm se presenta degradación.

Concentración ARNm (BspQI): 1,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ kb

Concentración ARNm (NotI): 1,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ kb

Electroforesis en gel de agarosa al 1%, ARNm con cap 5'



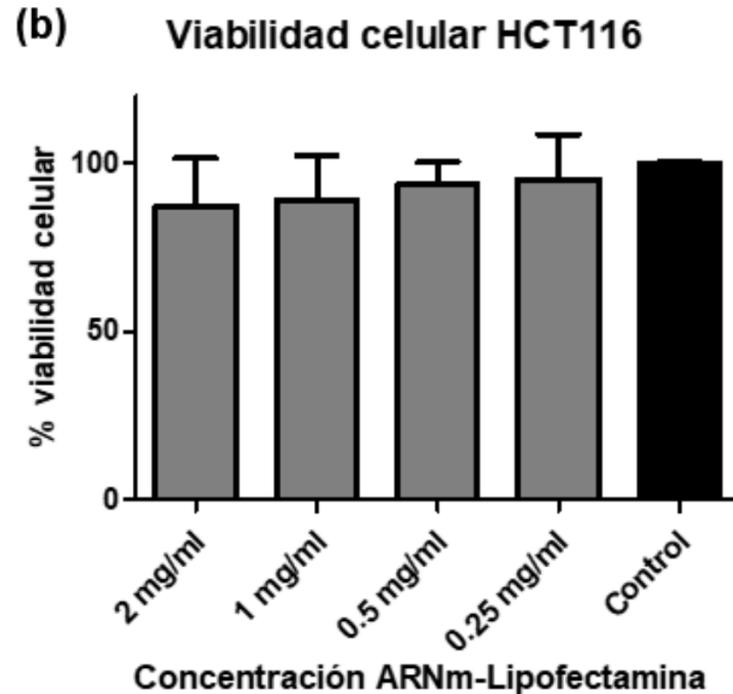
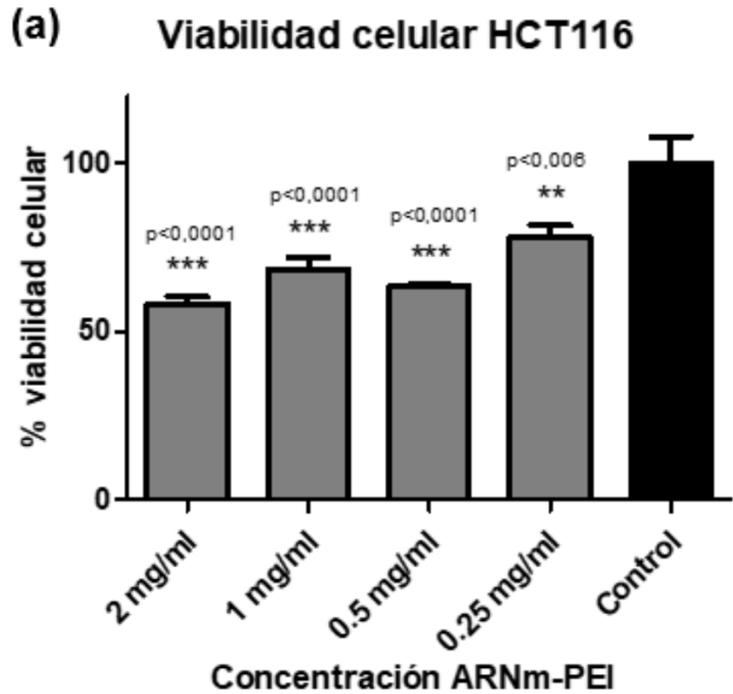
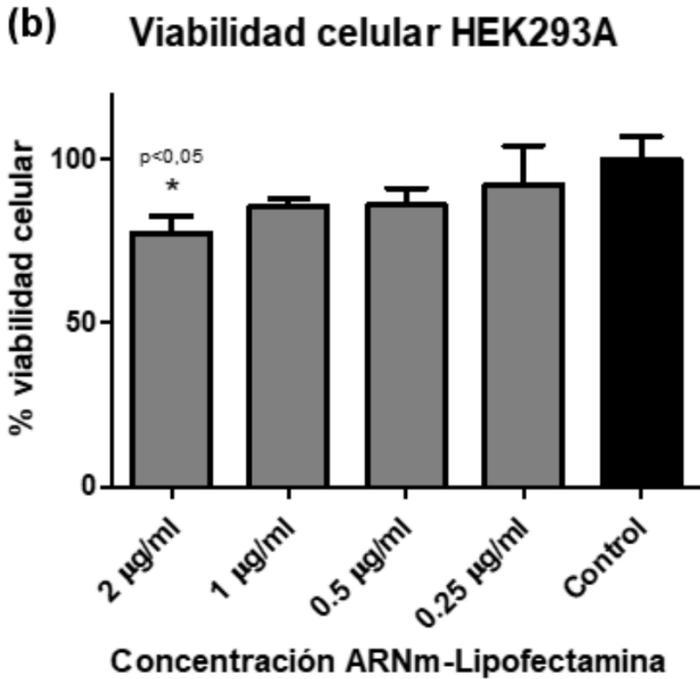
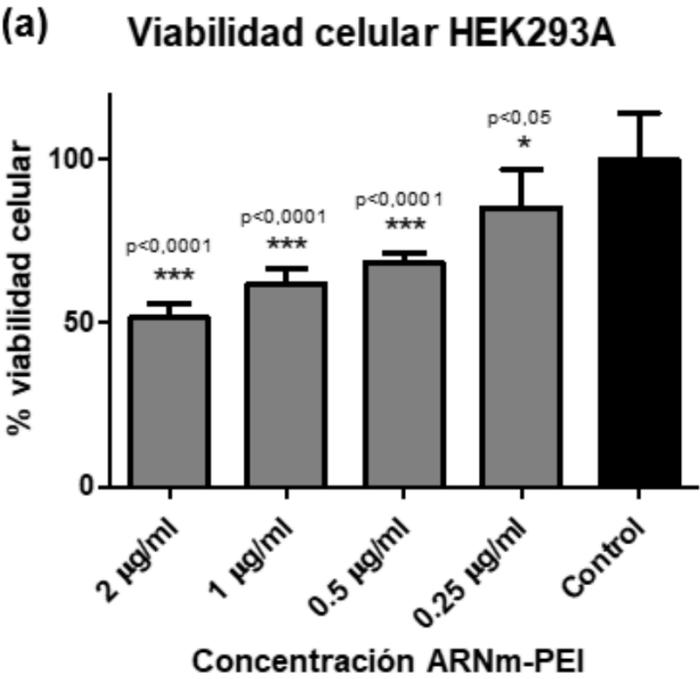
Carriles: PM, marcador de peso molecular; 1, ARNm con cap 5' (flecha roja).

Concentración ARNm con cap 5': 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$

Evaluación de la viabilidad celular

Viabilidad en células HEK293A a diferentes concentraciones entre ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina

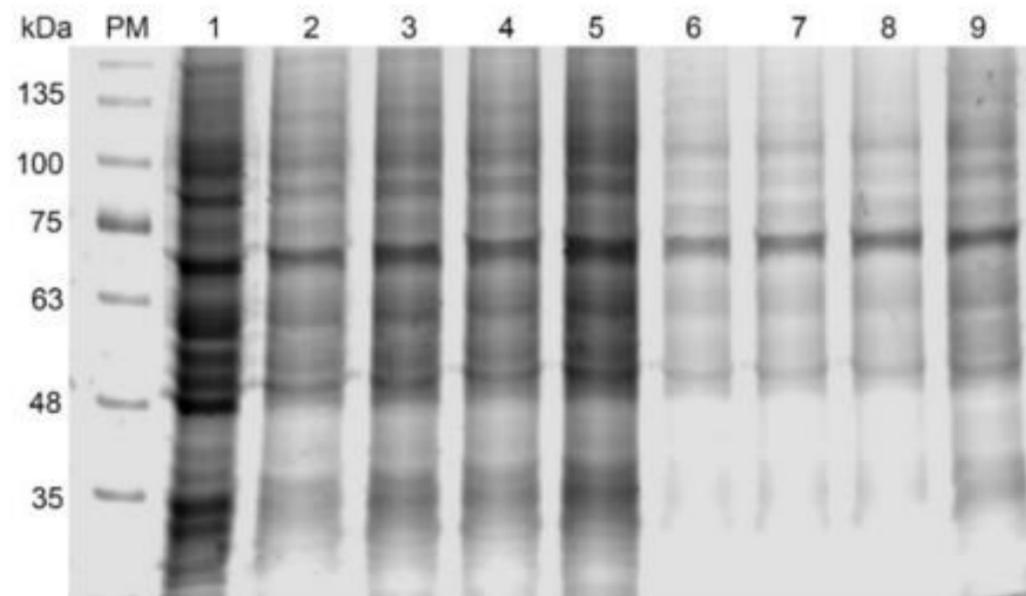
Viabilidad en células HCT116 a diferentes concentraciones entre ARNm-PEI y ARNm-Lipofectamina



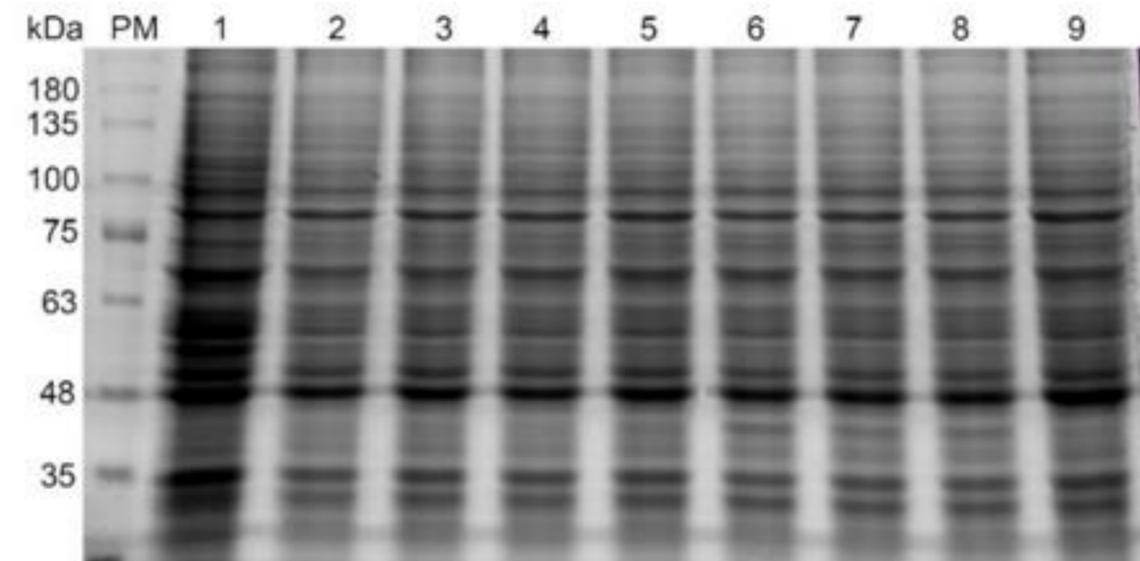
(a) Tratamiento con ARNm-PEI. (b) Tratamiento con ARNm-Lipofectamina. El asterisco indica las concentraciones que afectan a la viabilidad celular de forma significativa (p<0,05).

Análisis de la expresión del antígeno

Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante de la expresión del antígeno Gn/Gc en HEK293A



Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante de la expresión del antígeno Gn/Gc en HCT116



Tamaño de las proteínas:

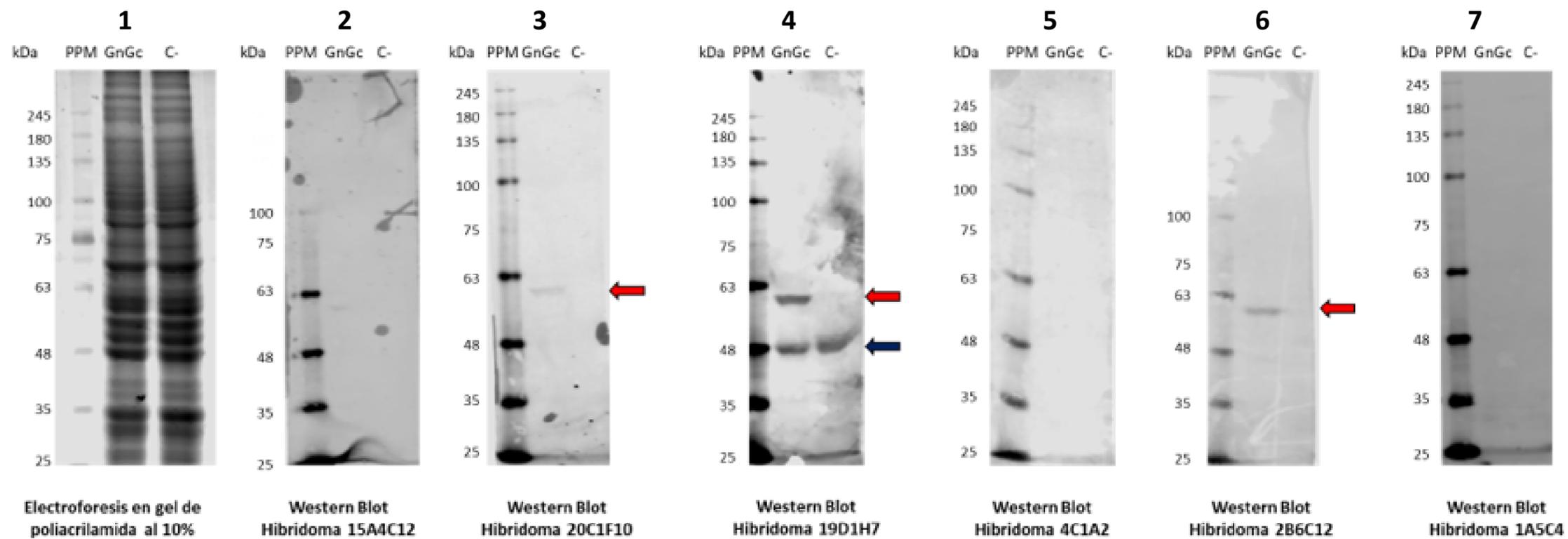
Gn: 80,5 kDa

Gc: 57 kDa

Carriles: PM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB 10-245 kDa;
1, control positivo (Gn/Gc); 2, ARNm-PEI A; 3, ARNm-PEI B;
4, ARNm-PEI C; 5, control negativo PEI; 6, ARNm-Lipofectamina A;
7, ARNm-Lipofectamina B; 8, ARNm-Lipofectamina C;
9, control negativo Lipofectamina.

Análisis de la expresión del antígeno

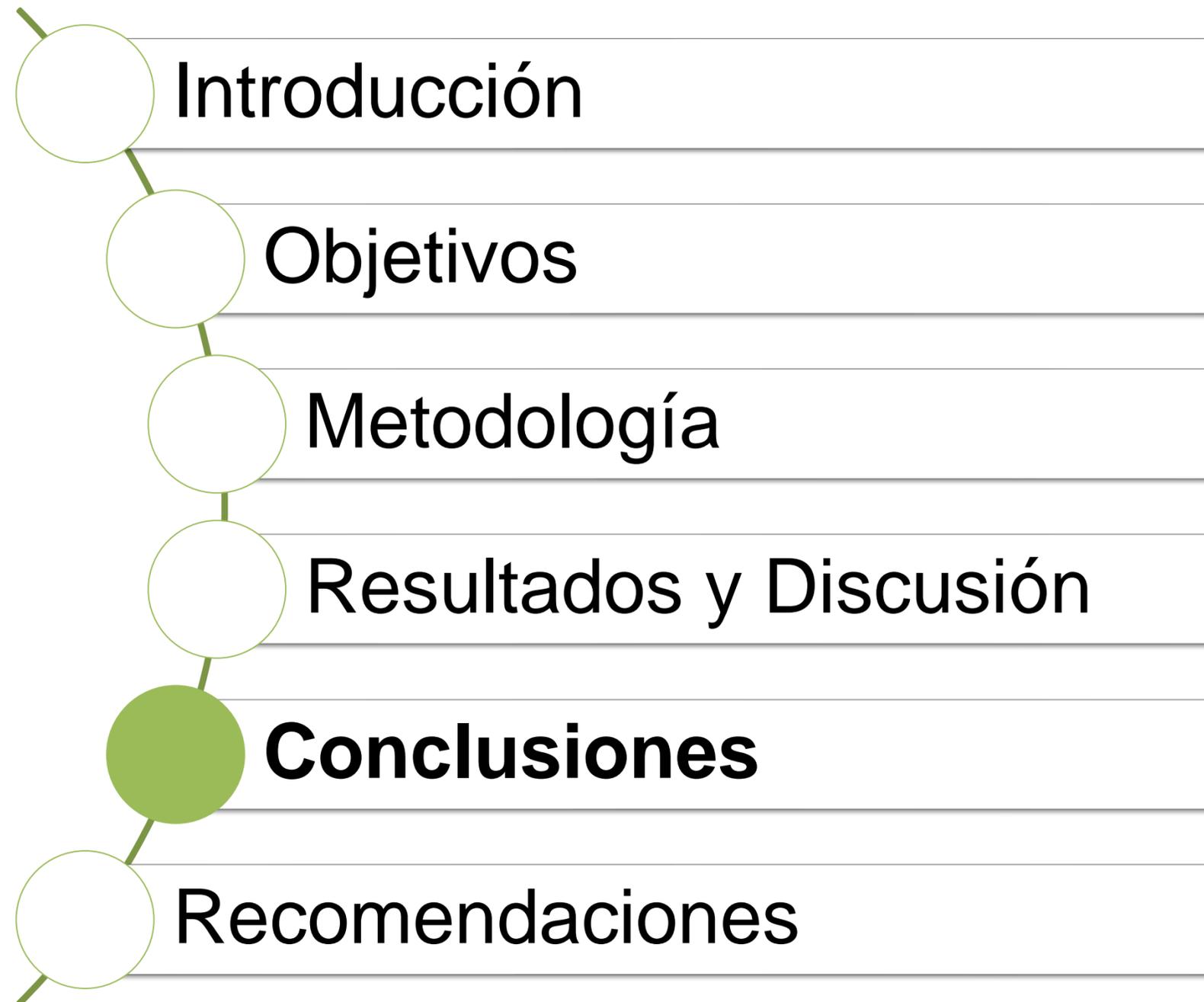
Análisis mediante SDS-PAGE al 10% denaturante y Western Blot de hibridomas productoras de anti-Gn/Gc



Tamaño de las proteínas:

Gn: 80,5 kDa
Gc: 57 kDa

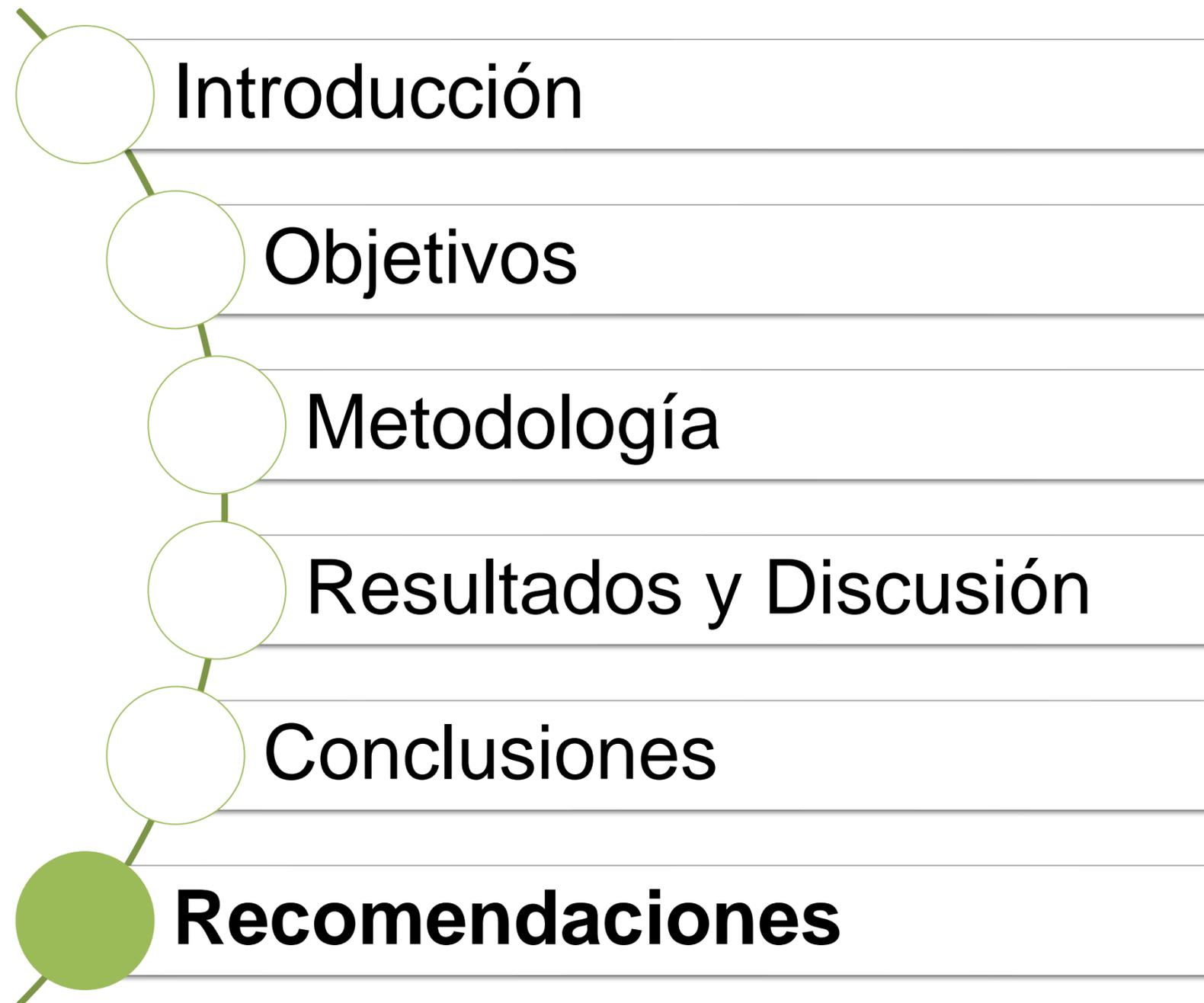
Carriles: PPM, marcador de peso molecular AccuRuler RGB PLUS 10-245 kDa; GnGc, glicoproteínas Gn/Gc; C-, control negativo Gn/Gc. Las flechas rojas indican que se detectó señal del anti-Gn/Gc y la flecha negra que se detectó una señal inespecífica.



El correcto diseño de la unidad transcripcional simulando las características del ARNm eucariota maduro y aplicando optimizaciones a los elementos estructurales básicos mejoran la expresión del ARN mensajero.

La estandarización de las condiciones de la transcripción *in vitro*, mediante la purificación de la molécula y la eliminación de ARNasas, contribuye a evitar la degradación del ARN mensajero y aumentar su estabilidad.

La transfección del ARN mensajero con PEI resulta tóxico para las células, mientras que su administración con Lipofectamina no tiene efectos significativos en la viabilidad celular.



Se recomienda tomar las precauciones necesarias durante el trabajo con el ARN para evitar su contaminación y degradación, preferiblemente tener un lugar de trabajo y material exclusivo para su manipulación.

Se sugiere eliminar completamente el suero fetal bovino antes de la transfección y el análisis de la expresión del antígeno para que no exista interferencia.

Se recomienda probar la transfección del ARNm transcrito *in vitro* con nanopartículas lipídicas y nucleósidos modificados para evitar su degradación e incrementar la eficacia de traducción.

Se sugiere no utilizar PEI como reactivo de transfección de ARN mensajero por su alta toxicidad para las células de mamíferos.



Laboratorio de Biotecnología y Biofármacos
Universidad de Concepción, Chile

Dra. Thelvia Ramos, PhD(c)

Directora

Universidad de las Fuerzas Armadas, Ecuador

Dr. Jorge Roberto Toledo, PhD

Director

Universidad de Concepción, Chile

Ing. Carlos Villacís

Universidad de Concepción, Chile

Familia, amigas y amigos