

Trabajo domiciliario N°1

Clonado recombinogénico

En la actualidad, el mundo está atravesando la propagación de un nuevo coronavirus, el SARS-CoV-2 (del inglés, *Severe Acute Respiratory Síndrome Coronavirus 2*), causante de la enfermedad denominada COVID-19 (del inglés, *Coronavirus Disease 2019*). Lo que se sabe hasta el momento es que el virus apareció en la ciudad china de Wuhan, en diciembre de 2019, y se considera que pasó de un hospedador animal (posiblemente murciélagos) a los seres humanos. Debido a la rápida expansión de la enfermedad, en enero del corriente año la Organización Mundial de la Salud la declaró **emergencia sanitaria de preocupación internacional**, y posteriormente fue reconocida como **pandemia**.

SARS-CoV-2 es un virus esférico (~50 a 200 nm de diámetro), envuelto de una bicapa lipídica, y contiene un genoma de ARN (~30 Kb) monocatenario de polaridad positiva. El genoma del virus codifica cuatro proteínas estructurales: la proteína S (*Spike protein*), la proteína E (*Envelope*), la proteína M (*Membrane*) y la proteína N (*Nucleocapsid*). En el hospedador humano, la proteína ACE2 (del inglés, *Angiotensin Converting Enzyme 2*) se une a S de la cápside viral, y constituye el receptor de entrada celular para el virus.

Además de las medidas preventivas que se están llevando a cabo para evitar la propagación de SARS-CoV-2 (distanciamiento social, lavarse frecuentemente las manos con agua y jabón, etc.), laboratorios de todo el mundo se encuentran en fase de investigación trabajando en el desarrollo de métodos de diagnóstico, vacunas y antivirales.

Dado que ustedes conformaron una *Start-up* biotecnológica dedicada al desarrollo de pruebas de concepto y bienes y servicios al nivel de prototipos, ante la actual emergencia viral, decidieron proponer un plan de trabajo (factible de ser realizado), para presentarlo en las convocatorias que el Estado argentino está destinando para enfrentar a la pandemia. En particular, idearon los siguientes puntos:

- Generar una construcción genética que posibilite expresar a las 4 proteínas estructurales de SARS-CoV-2 en células de mamífero. Solo para el caso de la proteína *Spike* (dado que está sometida a presiones evolutivas y puede cambiar), decidieron posibilitar que la construcción genética sea un vector de destino para el sistema Gateway (y así poder incorporar variantes de esta).

Además, eligieron que la construcción genética pueda ser integrada en el genoma de células de mamífero de manera precisa y controlada.

- Evaluar conceptualmente que la construcción genética anterior tolera la inserción de versiones de *Spike*, que puede integrarse en el genoma de células de mamífero, y que expresa VLPs (*Virus Like Particles*), las cuales pueden funcionar como potencial prototipo vacunal.

Para acelerar los tiempos, decidieron utilizar como única estrategia de clonado molecular para generar la construcción genética la metodología *Lambda Red* y evitar el uso de enzimas de restricción y DNA ligasa. Para la integración al genoma de células animales, eligieron el sistema Cre/loxP.