

## EL RETO DE PRODUCIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES HUMANAS EN LEVADURAS, FUE LA VISIÓN QUE ENMARCÓ LA HISTORIA DEL IEIM.

*"Un recorrido por la historia del IEIM en la búsqueda de un tratamiento para las enfermedades de depósito lisosomal con la producción de enzimas humanas en microorganismos"*  
Semillero de investigación IEIM

Cuando un estudiante se acerca al semillero de investigación del Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) y toma un puesto en el laboratorio, muchas veces no logra imaginarse que no sólo probará los conocimientos recibidos en su carrera; sino que pasará a formar parte de una gran familia interdisciplinaria y trabajadora, dedicada día a día al diagnóstico y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades de depósito lisosomal (EDL). Estas enfermedades son consideradas raras debido a su baja prevalencia sobre la población en general, y cuya principal causa se atribuye principalmente a mutaciones o cambios en la información genética de un gen, provocando una alteración sobre la funcionalidad de esta proteína encargada de la limpieza y degradación de moléculas específicas presentes en los lisosomas de las células<sup>1</sup>. Sin embargo, lo que pocos conocen es que muchas no tienen tratamiento, y ellos siguen buscando la forma de brindarles una mejor calidad de vida a los pacientes.

Desde hace más de 20 años, el IEIM trabaja en una estrategia terapéutica conocida como la Terapia de Reemplazo Enzimático (TRE), la cual aprovecha la capacidad de la célula de tomar e internalizar compuestos para corregir un defecto celular interno. En nuestro caso las proteínas producidas a partir de microorganismos en el laboratorio, son suministradas y captadas por las células de pacientes que no la tienen, para que sea llevada hasta el lisosoma donde va a degradar las moléculas acumuladas. Sin embargo, obtener una proteína humana a bajo costo que pueda ser empleada para el tratamiento de pacientes con EDL, es un gran reto, que supone encontrar una biofábrica de producción económica y rápida. Este gran reto lo abordó el Dr. Luis Alejandro Barrera junto a sus estudiantes e investigadores en los inicios del IEIM, y que con los años se ha mantenido como una de las principales líneas de investigación del instituto, logrando al año 2020 producir en las biofábricas: *Escherichia coli* (bacteria) y *Pichia pastoris* (levadura), cuatro proteínas humanas recombinantes (GALNS, IDS, Hex-A, Hex-B y NAGLU). Este proceso cargado de gran esfuerzo, dedicación y maravillosas experiencias es el que nos motiva el día de hoy a narrarles esta historia.

### **Primeros pasos hacia una proteína recombinante humana**

En los primeros años de creación del IEIM, la motivación se centró en una enfermedad poco conocida y de alto costo, la enfermedad de Hunter o MPS II<sup>2</sup>. En esta enfermedad se habían descrito resultados prometedores en la TRE como una estrategia terapéutica, pero los altos costos de producción impedían ser asequible para los pacientes EDL en Colombia, razones suficientes para que este grupo interdisciplinario de investigadores planteara una solución que les permitiera obtener la misma proteína IDS recombinante, pero en sistemas biológicos cuya menor complejidad alivianara los costos de producción.

---

<sup>1</sup> **Lisosomas:** Son orgánulos celulares capaces de degradar y reciclar una variedad de sustratos complejos incluyendo glicosaminoglicanos, esfingolípidos, glicógeno y proteínas. Funcionando de esta manera como el sistema digestivo de la célula.

<sup>2</sup> **Mucopolisacaridosis tipo II (MPS II) o enfermedad de Hunter.** La cual es una enfermedad causada por la deficiencia de la enzima IDS encargada de remover los sulfatos presentes en el ácido L-idurónico del heparán sulfato y dermatán sulfato.

Entonces para el 2002 bajo la mentoría del Dr. Barrera, se forma el primer estudiante de doctorado, la Dra. Patricia Landázuri, quién tenía la difícil tarea de modificar un sistema biológico de menor complejidad como la bacteria *Escherichia coli* e integrarle el gen de la proteína IDS humana para producir la proteína recombinante (IDShr) durante su crecimiento. Obteniendo en sus primeros resultados la posibilidad de producir no solo una proteína IDS madura y con actividad biológica, sino que aportó de manera significativa nuevo conocimiento sobre la expresión de proteínas humanas en bacterias, esto generó nuevas interrogantes y la formación de más estudiantes de doctorado, maestría y pregrado, entre ellos el Dr. Raúl Poutou quién evaluó diferentes estrategias de producción que permitieron posteriormente aumentar la producción de dicha proteína. Sin embargo, ellos encontraron que esta enzima no tenía todas las características propias de la proteína IDS humana. Sin embargo, este descubrimiento no descartó a este sistema como biofábrica para una alternativa terapéutica, más bien estimuló nuevas ideas que continuaron trabajándose en las manos de nuevos y grandes investigadores.

### **Un cambio en la producción de IDS recombinante**

Una alternativa a este descubrimiento fue plantearse el uso de microorganismos eucariotas, como la levadura *Pichia pastoris* (*K. phaffi*); cuya estrategia podría ofrecerles una metodología rápida, eficiente y económica. Este nuevo reto lo asumieron el Dr. Henry Córdoba y el Dr. Raúl Poutou, logrando obtener las primeras levaduras (*P. pastoris*) modificadas con la información genética requerida para producir la proteína IDShr. Mientras ellos evaluaban diferentes condiciones de cultivo y escalado para mejorar la producción de la proteína IDShr, el Dr. Homero Sáenz realizaba procesos preliminares de purificación y estudios computacionales para tener un mejor conocimiento de su estructura tridimensional. Logrando para esta fecha aumentar el volumen de producción, caracterizar la enzima y comparar su estructura con otras proteínas de la misma familia. Lo cual generó en el IEIM una gran satisfacción al estar más cerca de su objetivo inicial y además, demostrar que las levaduras son una plataforma biológica interesante para continuar la producción de enzimas, con actividad biológica y modificaciones similares a las encontradas en las proteínas humanas.

*"Ahora sabemos que la levadura Pichia pastoris es capaz de producir una enzima humana como la IDS activa y funcional, pero ¿Podemos extrapolarlo a otras proteínas lisosomales?"*

*Estudiante IEIM*

### **Ampliando el panorama a otras enfermedades de depósito lisosomal**

En el año 2009 los Dres. Carlos Javier Alméciga y Alexander Rodríguez iniciaron un nuevo reto, producir de forma recombinante la enzima GALNS, una enzima que podría ser utilizada como alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Morquio A o MPS IVA. Este nuevo proyecto, vinculó más estudiantes e investigadores, no solo de la PUJ sino también de otras universidades, entre estos al Dr. Oscar Sánchez, en esa época funcionario de la Universidad de los Andes; quienes emprendieron este camino, retomando aquellos trabajos y experiencias con la proteína IDShr. El modelo inició con la producción de la proteína GALNS en *Escherichia coli* ensayando diferentes modificaciones moleculares estudiadas previamente por biología computacional y diferentes metodologías desde la ingeniería de bioprocesos en las condiciones de cultivo. Esto requirió de mucho esfuerzo por varios años y de fortalecer el grupo con nuevos estudiantes de microbiología industrial, bacteriología y biología, que conformaran el semillero de investigación así como estudiantes de maestría y doctorado. De esta forma se logró, mejorar la producción de la proteína recombinante GALNS y aumentar su actividad enzimática, y además se generaron nuevas preguntas

en torno al funcionamiento e interacción de la enzima GALNS con otros sustratos. Un aporte importante en este momento, fue confirmar que al no ser ésta bacteria capaz de producir modificaciones postraduccionales, como las N-glicosilaciones, no se puede llevar a cabo el proceso de internalización y captura de esta proteína dentro de las células humanas (estudios *in-vitro* realizados por la actual candidata a Dra Ángela Mosquera -UdeA). Con estos resultados, la actual candidata a Dra. Natalia Pimentel -UFRGS, Brazil- en conjunto con investigadores de la Universidad de Cornell, realizaron los primeros ensayos para producir la proteína GALNS<sub>hr</sub> en una cepa de *E. coli* modificada por ingeniería genética con la capacidad de producir las modificaciones postraduccionales mínimas para ser internalizada por la células y direccionada al lisosoma. Esta nueva biofábrica continúa en estudio hasta la fecha.

### **Retomando los estudios en la levadura *P. pastoris***

Teniendo en cuenta que las glicosilaciones son una estructura importante en la captura celular dentro de los modelos estudiados, el grupo de investigación retoma los estudios realizados con IDS<sub>hr</sub> para producir ahora la proteína GALNS en la levadura *P. pastoris*, de nuevo abordando los diferentes aspectos de producción, purificación y caracterización. Esto generó importantes aportes al conocimiento científico, resaltando el gran potencial de las levaduras como grandes biofábricas para la producción de proteínas recombinantes humanas en la TRE. Además, este proceso estuvo acompañado de una gran cantidad de publicaciones en revistas científicas, así como su divulgación en congresos y reconocimientos nacionales e internacionales de nuestros estudiantes con sus ponencias, y menciones honoríficas de varios trabajos de grado

*"Hasta este momento, el mejor resultado parece ser muy satisfactorio y alentador para nuestros investigadores, ya que se demostró que en *P. pastoris* nosotros podemos producir tanto las enzimas humanas IDS y GALNS"*

### **Nuevas proteínas que han ido ampliando el panorama**

Estos trabajos incentivaron al IEIM a seguir estudiando otras enzimas lisosomales requeridas para el desarrollo de otros productos terapéuticos enfocados en las enfermedades de depósito lisosomal, y con ello dar el primer paso a la producción de  $\beta$ -hexosaminidasas, las cuales podrían ser una alternativa para el tratamiento de las enfermedades clasificadas como gangliosidosis GM2. En su trabajo doctoral la Dra. Angela Johana Espejo, usó la levadura *P. pastoris* GS115 para la producción de  $\beta$ -hexosaminidasas lisosomales, evaluando su producción, purificación y caracterización, llegando a demostrar que las hexosaminidasas producidas en *Pichia pastoris* son internalizadas por diferentes líneas celulares incluyendo células neuronales enfermas con estas patologías, donde logran restablecer la normalidad de las células afectadas. Este hallazgo ha promovido continuar con la investigación en el efecto del tratamiento sobre el daño neurológico presente en estos pacientes requiriendo evaluar diferentes vehículos de entrega como nanopartículas, que permitan llevar estas enzimas hasta el cerebro. En el 2019 se iniciaron los primeros ensayos *in-vitro* con nanopartículas fusionadas a  $\beta$ -hexosaminidasas como un nuevo producto terapéutico empleado para el tratamiento de gangliosidosis GM2, proceso que continua en estudio y que se espera pueda ser útil para extrapolarlo a otras enfermedades con compromiso neuronal.

*"Demostramos que P. pastoris puede producir otras enzimas lisosomales humana, pero ¿Estas enzimas son iguales a las que produce una célula humana? ..."*

### **El camino a la “humanización” de las proteínas recombinantes**

Observando el gran potencial de las levaduras como biofábricas de proteínas recombinantes humanas, pero centrandó la atención en las modificaciones postraduccionales, específicamente las N-glicosilaciones producidas por esta levadura, las cuales son similares a las humanas salvo contadas especificaciones, surgió un nuevo interrogante ¿Las modificaciones realizadas por levaduras pueden tener un factor negativo sobre los pacientes con EDL? Para resolver este nuevo interrogante, surgieron nuevos retos y proyectos, entre los cuales se planteó modificar genéticamente una cepa de levadura para que ofreciera un sistema de glicosilaciones mucho más cercano al modelo humano. Para esto el Dr. Alexander Rodríguez en su trabajo doctoral en colaboración con la Universidad de Ghent, Bélgica, obtuvieron la levadura *P. pastoris* NRRLY 11430  $\Delta$ OCH1 para producir la proteína GALNS con glicosilaciones similares casi iguales a las presentes en células humanas, ofreciendo de esta manera una nueva biofábrica para la producción de cualquier enzima lisosomal humana con glicosilaciones humanizadas.

*"A pesar de que las N-glicosilaciones de levaduras presentan una diferencia en tamaño y composición comparado con las proteínas humanas, éstas pueden ser rediseñadas con glicoingeniería"*

### **El futuro para el semillero de formación del IEIM**

Los resultados obtenidos hasta ahora por el IEIM, en todas sus líneas de investigación van de la mano de la mentoría de excelentes investigadores líderes y la dedicación de un “batallón” de intrépidos y sorprendentes estudiantes de la facultad de ciencias de la PUJ, el futuro de estas investigaciones está ampliamente sostenido por los estudiantes del semillero de investigación, y estudiantes de posgrado. En este semillero nuestros estudiantes profundizan inicialmente sus conocimientos recibidos en clase, para luego proponer desde sus carreras nuevas ideas para mejorar la producción de estas proteínas recombinantes humanas y ejecutar con independencia sus proyectos, de este modo incentivamos en ellos su incorporación en el fascinante mundo de la investigación. En este último periodo del 2020, Nicolle Rincón de la carrera de Microbiología Industrial bajo la tutoría de los Dres. Carlos Javier Alméciga y Alexander Rodríguez, evalúa posibilidad de incluir nuevos marcadores celulares que permitan evaluar el potencial de GALNS. Bajo la tutoría de la Dra. Angela Johana Espejo, las estudiantes Heidy Triana de la maestría en Ciencias Biológicas y Gabriela Solarte de la carrera de Microbiología, trabajan en la producción de otra enzima lisosomal llamada NAGLU que se está siendo evaluada en este momento como un posible tratamiento para la enfermedad de San Filippo o MPS III. Paula Corchuelo, Daniela Solano y Natalia Triviño, iniciaron los ensayos de producción de  $\beta$ -hexosaminidasas en la cepa *P. pastoris* NRRLY 11430. Adicionalmente, el joven investigador Rafael Garzón, egresado de Microbiología Industrial, y Zully Pulido estudiante de la carrera de Bacteriología están optimizando la producción, purificación y entrega de proteínas al sistema nervioso central mediante el uso de nanopartículas.

Durante muchos años la gran familia IEIM ha ido creciendo, con la participación de estudiantes propios y visitantes, que bajo la tutoría y acompañamiento de sus líderes han formado excelentes

profesionales desde sus líneas de investigación, hoy fue el turno para la Terapia de Reemplazo Enzimático que hace parte de la línea de investigación Herramientas biotecnológicas en EIM, en otra ocasión tendremos la oportunidad de hablar sobre las demás temáticas de esta línea de investigación, así como de los trabajos que se han realizado en otras líneas del IEIM, como las “Bases Celulares y Moleculares de los EIM”, y “Diagnóstico de EIM” . Ya que no solo gracias al sueño de encontrar una alternativa de TRE más económica para los pacientes menos favorecidos, sino a las demás líneas de investigación que conforman el IEIM y que inició el Dr. Luis Alejandro Barrera se han formado grandes investigadores en los últimos años bajo su tutoría, así como los que desde hace 5 años bajo la dirección del Dr. Carlos Javier Álméciga, quien continúa con el legado del D Barrera en el crecimiento y avance del IEIM.