

Desarrollo de sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes de interés industrial © 2022 by Amaranto, Marilla is licensed under Creative Commons [Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

DESARROLLO DE SISTEMAS DE EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERÉS INDUSTRIAL

Tesis para optar por el título de Doctora en Ciencias
Químicas por

Farm. Marilla Amaranto

Director: Dr. José Luis Barra

Co-director: Dr. José Luis Daniotti (2017-2020[†])

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA RANWEL CAPUTTO
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE
CÓRDOBA (CIQUIBIC-CONICET)

DIRECTOR DE TESIS

Dr. José Luis Barra

COMISIÓN ASESORA DE TESIS

Dr. Dante Miguel Beltramo

Dr. Gustavo Bonacci

Dr. José Luis Daniotti (2017-2020[†])

Dr. Alejandro Vilcaes
(en reemplazo del Dr. José Luis Daniotti)

EVALUADOR EXTERNO

Dr. Marcos Oggero Eberhardt

AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento,

A las instituciones que aportaron, con espacio, educación pública y financiamiento, lo necesario para la realización de mi tesis doctoral; es decir a la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba, al Departamento de Química Biológica Ranwel Caputto, al CIQUIBIC, a la Agencia Nacional de Producción Científica y Tecnológica, a la SeCyT, y al CONICET.

A mi director de Tesis, el Dr. José Luis Barra, por abrirme las puertas de su laboratorio y por confiar en mí. Le agradezco por todas sus enseñanzas, por su dedicación y calidad humana, por haber estado disponible cada vez que lo precisé y por haberme dejado aprender y emprender a mi manera, con paciencia.

A los miembros de mi comisión de Tesis, el Dr. Dante Beltramo, el Dr. Gustavo Bonacci, el Dr. José Luis Daniotti, a quien recordamos con cariño, y el Dr. Alejandro Vilcaes, por acompañarme durante estos años mostrando siempre interés y confianza en mis resultados. Valoro mucho su buena predisposición y sus aportes tanto durante el desarrollo de mi Tesis, así como durante el proceso de escritura. También agradezco al evaluador externo, el Dr. Marcos Oggero Eberhardt, quien amablemente aceptó la tarea de leer y evaluar esta Tesis.

A la Dra. Agustina Godino, por los momentos compartidos, de enseñanza, experimentos, viajes y amistad. Agradezco toda la ayuda que me brindaste resolviendo mis dudas y explicándome cosas. Gracias Agus por haberme acompañado en el desarrollo de esta Tesis, sin vos no hubiera sido lo mismo.

A mis compañeres de laboratorio, Javi y Tati con quienes disfruté mucho todos estos años, gracias por los momentos compartidos. Javi, gracias por tu amistad y por traer la diversión al laboratorio con tus chistes y ocurrencias.

A todos los miembros del CIQUIBIC, por estar siempre dispuestos a ayudar, colaborar y brindar consejos.

Finalmente, a mi familia por su apoyo incondicional y por haberme acompañado durante todo el proceso de mi doctorado. A mi mamá Sandra y a mis hermanas, Cami y Meli, que escucharon cada una de mis presentaciones y mis problemas experimentales. A mi pareja Guille, por haberme acompañado y escuchado con mucha paciencia, en los momentos difíciles y en la escritura de la Tesis. Haber llegado hasta aquí no hubiera sido posible sin ninguno de ustedes.

Gracias.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	1
LISTA DE FIGURAS	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
ABSTRACT	6
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
1. Introducción	9
2. Objetivos	10
CAPÍTULO I – NUEVA ETIQUETA DE AFINIDAD AUTOESCINDIBLE BASADA EN UNA INTEÍNA, PARA LA PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE EN <i>ESCHERICHIA COLI</i>	11
I.1. INTRODUCCIÓN	12
I.2. RESULTADOS	17
I.2.1. Expresión y purificación de la rhGH citoplasmática con la etiqueta de afinidad autoclivable VMA1	17
I.2.2. Expresión y purificación de una rhGH citoplasmática con etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaX o DnaB	19
I.2.3. Expresión y purificación de una rhGH periplásmica con etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal DnaX o DnaB	22
I.3. DISCUSIÓN	27
I.4. MATERIALES Y MÉTODOS	30
I.4.1. Técnicas de biología molecular	30
I.4.2. Construcción de los plásmidos	30
I.4.3. Expresión y purificación de proteína	31
I.4.4. Análisis HPLC	32
I.4.5. Autoclivaje libre de resina	32
I.4.6. Efecto del pH del medio de cultivo en el clivaje in vivo de la inteína en periplasma	33
I.4.7. Producción de la rhGH en biorreactor	33
I.4.8. Análisis mediante espectrometría de masas	34

CAPÍTULO II - PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA LACTATO OXIDASA PARA APLICACIONES INDUSTRIALES MEDIANTE CULTIVO <i>FED-BATCH</i>	35
II.1. INTRODUCCIÓN	36
II.2. RESULTADOS	38
II.2.1. Expresión y purificación de la proteína rLOX desde cultivo en Erlenmeyer	38
II.2.2. Caracterización funcional de la rLOX en un kit diagnóstico comercial	38
II.2.3. Caracterización funcional de la rLOX en un biosensor	40
II.2.4. Producción de rLOX en biorreactor mediante cultivo <i>fed-batch</i>	42
II.3. DISCUSIÓN	44
II.4. MATERIALES Y MÉTODOS	47
II.4.1. Plásmido de expresión	47
II.4.2. Expresión y purificación de la proteína	47
II.4.3. Caracterización funcional en un kit diagnóstico	47
II.4.4. Caracterización funcional en un biosensor	48
II.4.5. Producción de proteína en biorreactor	49
II.4.5.1. Medio y soluciones	49
II.4.5.2. Etapa <i>batch</i> del cultivo en biorreactor	49
II.4.5.3. Etapa <i>fed-batch</i> del cultivo en biorreactor	50
CAPÍTULO III - EXPRESION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA ALFA-GALACTOSIDASA A HUMANA Y DE MUTANTES CON POTENCIAL ACTIVIDAD TERAPÉUTICA MEJORADA	51
III.1. INTRODUCCIÓN	52
III.2. RESULTADOS	58
III.2.1. Producción de la proteína GLA WT en células de mamífero en cultivo	58
III.2.1.1. Diseño de los plásmidos para la expresión de la GLA WT	58
III.2.1.2. Expresión de la proteína GLA WT en células CHO-K1 adheridas	59
III.2.1.3. Análisis de la N-glicosilación de la proteína GLA WT mediante el uso de tunicamicina	60
III.2.2. Búsqueda y análisis de mutantes de la proteína GLA más activas	61
III.2.2.1. Diseño de los plásmidos de expresión de las mutantes de la proteína GLA	61
III.2.2.2. Expresión de las mutantes de la GLA en células HEK 293F y posterior medición de la actividad específica	62

III.2.2.3. Purificación de las mutantes de la GLA y posterior medición de la actividad específica	64
III.2.2.4. Estabilidad de las mutantes de la GLA purificadas	64
III.2.3. Análisis del uso potencial de etiquetas de afinidad basadas en inteínas para purificar la rhGLA expresada en células de mamífero en cultivo	65
III.2.3.1. Plásmido para la expresión en células CHO-K1 de la rhGLA con la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaB	66
III.2.3.2. Expresión en células CHO-K1 de la rhGLA con la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaB	67
III.2.3.3. Expresión en células HEK 293F de la rhGLA con las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales DnaB y DnaX	68
III.3. DISCUSIÓN	70
III.4. MATERIALES Y MÉTODOS	74
III.4.1. Construcción de los plásmidos para la expresión de la GLA WT	74
III.4.2. Expresión de proteínas en células CHO-K1 adheridas	75
III.4.3. Ensayo con tunicamicina	75
III.4.4. Construcción de los plásmidos para la expresión de las mutantes de la rhGLA	76
III.4.5. Expresión de las mutantes de la proteína rhGLA en células HEK 293F	77
III.4.6. Ensayo enzimático para medir la actividad de la proteína GLA WT y mutantes	77
III.4.7. Purificación de las mutantes de la proteína rhGLA	78
III.4.8. Estabilidad de las mutantes de la proteína GLA purificadas	78
III.4.9. Construcción de los plásmidos para la expresión de la etiqueta de afinidad autoclivable DnaB N-terminal en células CHO-K1	78
III.4.10. Ensayo de clivaje para la mini inteína DnaB intracelular	79
III.4.11. Construcción de los plásmidos para la expresión de las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales	79
III.4.12. Ensayo de clivaje para las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales, DnaB y DnaX, provenientes de los sobrenadantes de células HEK 293F	79
CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS	81
BIBLIOGRAFIA	84

LISTA DE TABLAS

Tabla I-1. Constructos plasmídicos y cepas de expresión utilizados para la expresión de la rhGH.

Tabla III-1. Mutaciones realizadas en la proteína rhGLA WT.

LISTA DE FIGURAS

Figura I-1. Representación esquemática del *splicing* de una inteína.

Figura I-2. Representación esquemática de la estructura de una inteína.

Figura I-3. Representación de la secuencia de la hormona del crecimiento humana conteniendo 191 aa y comenzando con su primer aminoácido natural, Phe.

Figura I-4. Expresión, purificación y análisis de la rhGH citoplasmática utilizando la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal VMA1.

Figura I-5. Expresión y purificación de la rhGH citoplasmática con etiqueta de afinidad N-terminal, DnaX o DnaB, autoescindible.

Figura I-6. Análisis de la expresión de la proteína rhGH periplásmica con la etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal, DnaB o DnaX.

Figura I-7. Purificación y análisis de proteína rhGH periplásmica con la etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal, DnaX.

Figura II-1. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de la proteína rLOX.

Figura II-2. Análisis funcional de nuestra rLOX purificada en el kit de diagnóstico Lactate.

Figura II-3. Análisis funcional de la rLOX en el biosensor NovoSens.

Figura II-4. Producción de rLOX en biorreactor mediante cultivo *fed-batch*.

Figura III-1. Plásmidos de expresión para las proteínas recombinantes GLA (A, secuencia de nucleótidos no optimizada), GLA* (B, secuencia de nucleótidos optimizada para su expresión en células CHO-K1) y la proteína control DNasa I (C).

Figura III-2. Expresión de las proteínas rhGLA y rhGLA*, y la proteína control rhDNasa I en células CHO-K1.

Figura III-3. Tratamiento con tunicamicina de células CHO-K1 transfectadas con los plásmidos de expresión de la proteína GLA y de la proteína control DNasa I.

Figura III-4. Esquema representativo de la proteína rhGLA WT y las mutantes seleccionadas para ser expresadas desde el plásmido pCIneo.

Figura III-5. Expresión de las proteínas rhGLA WT y mutantes en células HEK 293F.

Figura III-6. Mutantes de la proteína GLA purificadas mediante cromatografía de afinidad a través del His-tag.

Figura III-7. Estabilidad de las mutantes de la GLA purificadas.

Figura III-8. Esquema representativo de las construcciones realizadas en el plásmido pCIneo para evaluar el funcionamiento de la mini inteína DnaB en las células CHO-K1.

Figura III-9. Expresión de la rhGLA con la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaB y análisis del clivaje intracelular de la misma.

Figura III-10. Esquema representativo de las construcciones realizadas en el plásmido pCIneo para evaluar el funcionamiento de las mini inteínas C-terminales, DnaB y DnaX, en las células HEK 293F.

Figura III-11. Análisis de la expresión y clivaje de las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales, DnaB y DnaX, fusionadas a la proteína rhGLA.

Figura III-12. Plásmido de expresión pCIneo para la expresión de la proteína rhGLA con los sitios de restricción que se generaron para poder realizar cambios a futuro.

ABREVIATURAS

rhGH: Hormona de crecimiento humana recombinante

CBD: Dominio de unión a quitina

DTT: Ditioneitol

aa: Aminoácido

Phe: Fenilalanina

Met: Metionina

rLOX: Lactato oxidasa recombinante

IPTG: Isopropil b-D-1-tiogalactopiranosido

LSDs: Enfermedades de depósito lisosomal

ERT: Terapia de reemplazo enzimático

FD: Enfermedad de Fabry

Gb3: Globotriaosilceramida

PCT: Chaperonas farmacológicas

ADAs: Anticuerpos antidrogas

rhGLA: Alfa-galactosidasa A humana recombinante

RESUMEN

La expresión heteróloga de proteínas ha permitido la producción de las mismas a gran escala, lo que en la mayoría de los casos difícilmente se puede conseguir desde sus fuentes naturales.

Este trabajo de Tesis tiene como objetivo contribuir en el campo de la biotecnología de proteínas recombinantes en tres aspectos particulares, los cuales se resumen a continuación.

Por un lado, usamos a la hormona de crecimiento humana (hGH) como proteína modelo para desarrollar e implementar una nueva etiqueta de afinidad autoclivable. Como la hGH es de uso terapéutico, no puede poseer aminoácidos extras y debe comenzar con su aminoácido natural que es la fenilalanina (Phe). Para purificar una proteína recombinante se puede usar una etiqueta de afinidad, la cual permite purificar mediante cromatografía de afinidad, una proteína de interés fusionada a la misma. Las inteínas son elementos que se pueden fusionar entre una proteína de interés y una etiqueta de afinidad, permitiendo en un proceso de autoescisión, liberar a la proteína de interés sin dejarle ningún aminoácido extra. Mediante la expresión de la hGH recombinante (rhGH), desarrollamos e implementamos una nueva etiqueta de afinidad de autoescisión inducible por cambio de pH y temperatura, basada en la mini inteína *Ssp DnaX*. Esta etiqueta se fusionó en el C-terminal de la rhGH, y en el N-terminal de la misma se adicionó un péptido señal periplásmico. Bajo una condición de cultivo a pH 8 (que evita la autoescisión *in vivo* de la inteína), esta etiqueta de afinidad permitió la expresión y posterior purificación de la rhGH portando el aa Phe en el N-terminal. En conclusión, diseñamos e implementamos un nuevo sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes periplásmicas, en *E. coli*, mediante una etiqueta de afinidad autoclivable, basada en la inteína *DnaX*, destinado principalmente a proteínas que contienen puentes disulfuro.

En segundo lugar, utilizamos a la L-lactato oxidasa (LOX) como proteína modelo, debido al interés en esta enzima que manifestaron dos empresas Nacionales (Wiener Laboratorios SAIC y NovoSens), para desarrollar un proceso biotecnológico para la producción de proteínas de uso industrial en *E. coli*, mediante un cultivo alimentado en un biorreactor. La LOX es una enzima biotecnológicamente importante que se utiliza en kits colorimétricos y biosensores para detectar lactato, un parámetro clave en el diagnóstico clínico, la medicina deportiva y la industria alimentaria. Mediante el uso de la LOX desarrollamos un proceso biotecnológico para la producción en *E. coli* de proteínas recombinantes de uso industrial en biorreactor. Produjimos la LOX de *Aerococcus viridans* recombinante fusionada a la etiqueta His-tag (rLOX). Mediante el análisis de esta proteína, pudimos demostrar que la enzima fusionada a la etiqueta de afinidad fue totalmente funcional tanto en un kit colorimétrico comercial para diagnóstico humano, como en un biosensor amperométrico para medir el ácido láctico en productos alimenticios, mostrando un rendimiento comparable al de las LOXs comerciales sin etiqueta de afinidad.

Como el uso industrial de la enzima LOX requiere una producción a gran escala, desarrollamos un proceso de cultivo alimentado en biorreactor y obtuvimos un rendimiento aproximadamente diez veces mayor que el obtenido en Erlenmeyer. La etiqueta de afinidad nos permitió un proceso de purificación fácil y altamente eficiente, y se recuperó una rLOX de alta pureza, después de un solo paso de purificación por cromatografía de afinidad. Este es un proceso simple, rápido y económico para la producción de la enzima LOX recombinante para uso industrial.

Finalmente, utilizamos la proteína terapéutica humana alfa-galactosidasa A (GLA) como proteína modelo para el desarrollo de sistemas productivos en células de mamíferos en cultivo y para la búsqueda de mutantes de dicha enzima con propiedades terapéuticas mejoradas. La GLA se utiliza en la terapia de reemplazo enzimático (ERT, por sus siglas en inglés) para el tratamiento de pacientes con la enfermedad de Fabry. A diferencia de las otras dos proteínas modelos que utilizamos, la GLA es una glicoproteína, por lo que para su expresión fue necesario utilizar células de mamíferos en cultivo (CHO y HEK). Logramos la expresión de la GLA recombinante en forma activa, tanto en células CHO adheridas como en células HEK en suspensión. Con el objeto de contribuir no sólo en el aspecto productivo de esta enzima, sino también en un desarrollo innovador, nos planteamos la búsqueda de mutantes de la GLA más activas como potenciales proteínas terapéuticas mejoradas. Expresamos y comenzamos a caracterizar un grupo de mutantes de la GLA descritas en la literatura como potencialmente más activas y algunas combinaciones de las mismas. Si bien los resultados en este tema son preliminares, dentro de las mutantes analizadas, aquellas conteniendo deleciones en el extremo C-terminal ($\Delta 7$ y $\Delta 10$) y la mutante puntual R252T, serían más activas y estables en solución que la GLA salvaje. Estas mutantes podrían superar algunas complicaciones asociadas con la ERT actual, ya que los tratamientos con dosis más bajas de estos mutantes podrían lograr un efecto terapéutico similar o superior al del enzima de tipo salvaje.

ABSTRACT

The heterologous expression of proteins has enabled their production on a large scale, which in most cases can hardly be achieved from their natural sources.

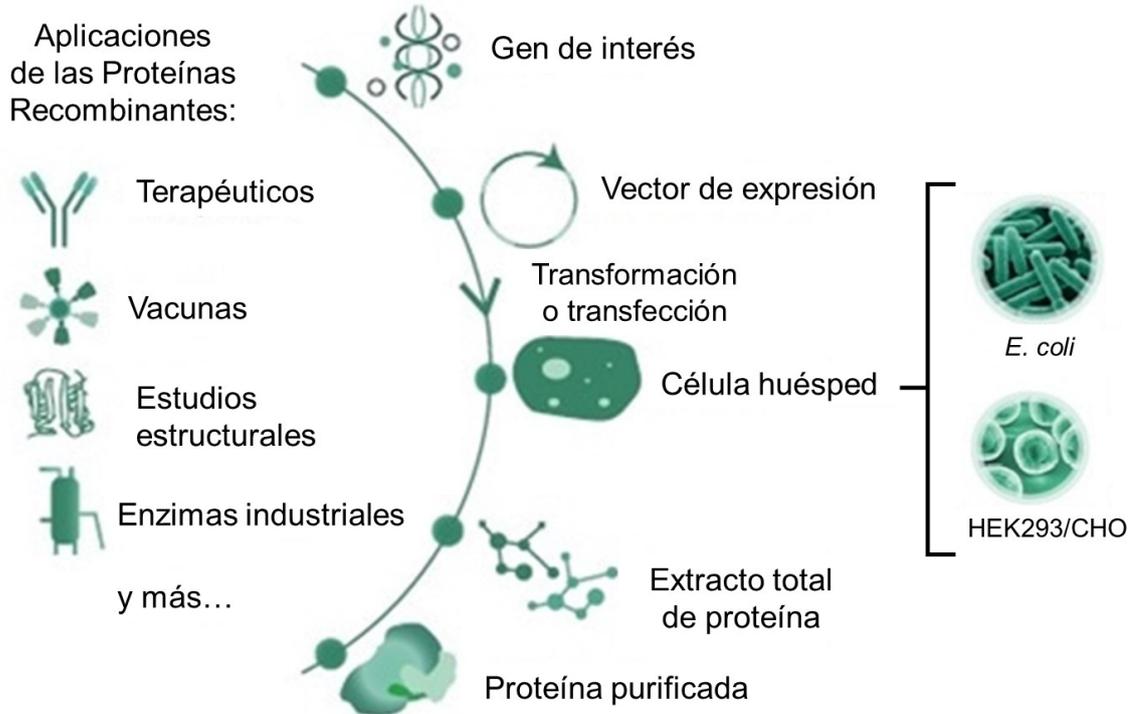
The aims of this thesis contribute in three particular aspects to the field of recombinant protein biotechnology, which are summarized below.

Firstly, we used the human growth hormone (hGH) as a model protein to develop and implement a new self-cleaving affinity tag. Considering that hGH is used therapeutically, it cannot have extra amino acids and must start with its natural amino acid i.e. phenylalanine (Phe). To purify a recombinant protein, an affinity tag can be used, which allows the fusion protein purification by affinity chromatography. Inteins are elements that can be fused between a protein of interest and an affinity tag, allowing (in a self-cleavage process) the protein of interest to be released without leaving any extra amino acids. Through recombinant expression of hGH (rhGH), we developed and implemented a new self-cleavage affinity tag inducible by pH and temperature change, based on mini-intein *Ssp DnaX*. This tag was fused to the C-terminus of rhGH, and a periplasmic signal peptide was added to the N-terminus thereof. Buffering the culture medium to pH 8 (which prevents *in vivo* self-cleavage of intein), the affinity tag enabled the expression and subsequent purification of rhGH carrying the aa Phe at the N-terminus. In conclusion, we designed and implemented a new system for the expression and purification of periplasmic recombinant proteins, in *E. coli*, by means of a new self-cleaving affinity tag, based on intein DnaX, aimed mainly to proteins containing disulfide bridges.

Secondly, we used L-lactate oxidase (LOX) as a model protein, due to the commercial interest by two national companies (Wiener Laboratorios SAIC and Novosens), to develop a biotechnological process for industrial purpose in *E. coli*, using a fed-batch culture in bioreactor. LOX is a biotechnologically important enzyme used in colorimetric kits and biosensors to detect lactate, a key parameter in clinical diagnostics, sports medicine, and the food industry. We produced the recombinant LOX from *Aerococcus viridans* fused to the His-tag (rLOX). Through the biochemical analysis of this protein, we were able to demonstrate that the enzyme fused to the affinity tag was fully functional in a commercial colorimetric kit for human diagnosis (Wiener Laboratorios SAIC). In addition, Novosens demonstrated that rLOX was functional in an amperometric biosensor to measure lactic acid in food products, with a performance comparable to commercial LOXs without an affinity tag. Since the industrial use of the LOX requires large-scale production, we developed a fed-batch process and obtained a yield of approximately ten times higher than in an Erlenmeyer flask. The affinity tag allowed an easy and highly efficient purification process, and a high pure rLOX was recovered after a single affinity chromatography purification step. This is a simple, rapid and inexpensive process to produce recombinant LOX enzyme for industrial use.

Finally, we used the human therapeutic protein alpha-galactosidase A (GLA) as a model protein to develop a productive system in cultured mammalian cells. In addition, we searched for GLA mutants with improved therapeutic properties. GLA is used in enzyme replacement therapy (ERT) to treat patients with Fabry disease. Unlike the other two model proteins that we have used, GLA is a glycoprotein and, therefore, cultured mammalian cells (CHO and HEK) had to be used for GLA expression. We achieved the expression of recombinant GLA in an active form, both in adhered (CHO) and in suspension cells (HEK). In order to contribute, not only, to the productive aspect of this enzyme, but also to innovative development, we set out to search for more active GLA mutants as potential improved therapeutic proteins. We expressed and began to characterize a group of GLA mutants described in the literature as potentially more active, and some combinations thereof. Although the results on this topic are preliminary, the mutants containing deletions at the C-terminal end ($\Delta 7$ and $\Delta 10$) and the point mutant R252T would be more active and stable in solution than *wild-type* GLA. These mutants might overcome some of the complications associated with the current ERT, as lower-dose treatments of these mutants could achieve a therapeutic effect similar to or better than that of the *wild-type* enzyme.

INTRODUCCIÓN GENERAL



1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años, se ha expandido rápidamente el uso de proteínas recombinantes con fines terapéuticos y de diagnóstico. Hasta la fecha, no se ha desarrollado una plataforma de expresión que reúna las características de un sistema de expresión eficaz, económico y seguro, y que permita expresar todo tipo de proteínas. (Pokora, 2020).

La mayoría de las proteínas recombinantes se producen actualmente en células procariotas (principalmente la bacteria *Escherichia coli*) y en una pequeña cantidad de líneas celulares de mamíferos bien caracterizadas, como las células de ovario de hámster chino (CHO). También otros sistemas están siendo utilizados, pero son menos comunes, como sistemas “*in vitro*” libres de células, algas, otras bacterias, levaduras, células de insecto en cultivo, células de plantas en cultivo, otras células de mamíferos en cultivo, plantas y animales transgénicos (Schillberg et al., 2019).

A pesar de la disponibilidad de numerosos métodos y sistemas de expresión, cada uno de ellos tiene sus propias ventajas y limitaciones (Desai et al., 2010). *E. coli* es ampliamente usado porque es un sistema bien caracterizado, con tiempos de producción muy cortos, escalable, simple, barato y con aprobación regulatoria (Burnett et al., 2020). Aunque su mayor limitación es que no permite la producción de proteínas glicosiladas. Para estas proteínas, los sistemas de expresión en células de mamífero en cultivo han tenido un desarrollo significativo que permite altos niveles de producción y una alta calidad de producto, además de contar con la aprobación regulatoria (Burnett et al., 2020).

La selección del sistema de expresión adecuado depende de la productividad, bioactividad, propósito y características fisicoquímicas de la proteína de interés. Además, la producción a gran escala de proteínas recombinantes sigue siendo un desafío a pesar de la creciente demanda de las mismas. En el campo de la biotecnología de proteínas recombinantes, los investigadores están constantemente desafiados a mejorar y optimizar los sistemas de expresión existentes, y también a desarrollar enfoques novedosos para hacer frente a las demandas de producir proteínas complejas (Schillberg et al., 2019).

Uno de los objetivos de nuestro grupo de trabajo es desarrollar e implementar una plataforma de expresión de proteínas recombinantes de interés industrial a escala de biorreactor en laboratorio. Posteriormente, estos desarrollos podrían ser transferidos a la industria y/o instituciones académicas, ya sea proporcionando la(s) proteína(s) de interés o el/los proceso(s) de producción. Este objetivo representa una nueva línea de investigación y desarrollo en nuestro grupo de trabajo, la cual se inició con la realización simultánea de esta Tesis Doctoral y el perfeccionamiento postdoctoral de la Dra. Agustina Godino, integrante de nuestro grupo académico.

Como sistemas experimentales iniciales, para el desarrollo de la plataforma de producción de proteínas recombinantes, elegimos la bacteria *E. coli* por ser un sistema relativamente simple y escalable; y células de mamífero en cultivo, ya que permiten la

producción de proteínas con modificaciones postraduccionales (como glicosilaciones). De esta manera cubrimos potencialmente un amplio espectro de proteínas. Para llevar a cabo nuestros objetivos, elegimos como proteínas modelo, proteínas de uso terapéutico y diagnóstico, ya que tienen requerimientos sobre los cuales pretendemos aportar con nuestro trabajo de investigación y desarrollo.

2. OBJETIVOS

Con el objeto de contribuir en el campo de la biotecnología de proteínas recombinantes, en el presente trabajo de Tesis Doctoral nos propusimos el siguiente objetivo general y objetivos específicos:

Objetivo General

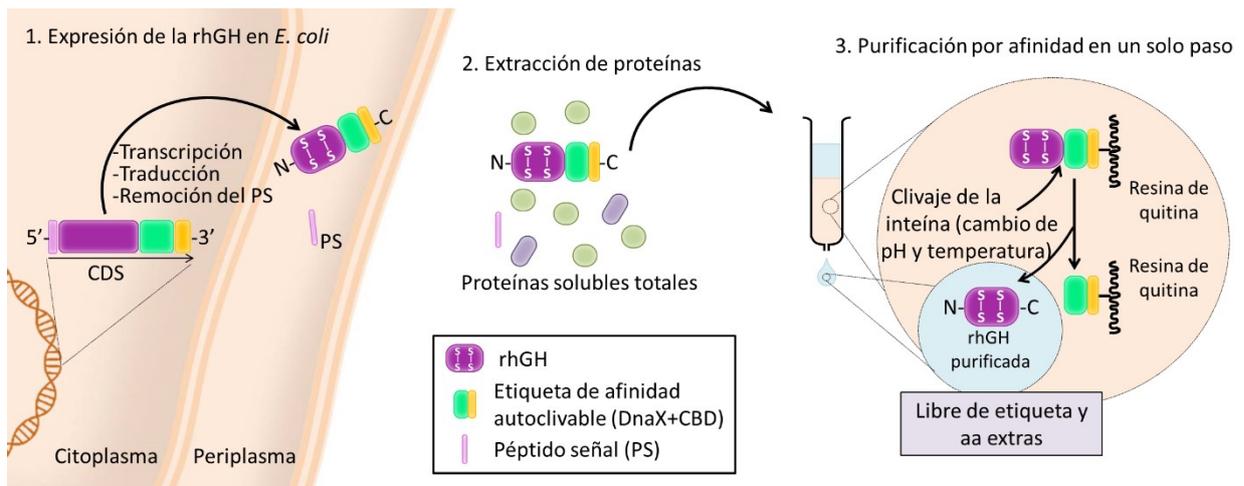
Desarrollar sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes de interés industrial.

Objetivos específicos

1. Desarrollar un nuevo sistema de expresión y purificación, mediante etiquetas de afinidad autoclivables, que permitan producir en *E. coli* proteínas recombinantes libres de aminoácidos extras.
2. Desarrollar un proceso biotecnológico, para la producción en *E. coli* de proteínas recombinantes de uso industrial en biorreactor, utilizando la proteína de interés industrial lactato oxidasa.
3. Expresar la proteína terapéutica alfa-galactosidasa A humana en célula de mamíferos en cultivo, y diseñar y caracterizar nuevas variantes con mayor actividad biológica que podrían mejorar el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

CAPÍTULO I

NUEVA ETIQUETA DE AFINIDAD AUTOESCINDIBLE BASADA EN UNA INTEÍNA, PARA LA PRODUCCIÓN DE LA HORMONA DE CRECIMIENTO HUMANA RECOMBINANTE EN *ESCHERICHIA COLI*



En este capítulo se desarrolló el objetivo específico uno. Utilizando como proteína modelo la hormona de crecimiento humana (hGH), se diseñó e implementó un nuevo sistema de expresión y purificación mediante etiquetas de afinidad autoclivables, para producir proteínas recombinantes libres de aminoácidos extras en *E. coli*.

I.1. INTRODUCCIÓN

La tecnología del ADN recombinante ha permitido la producción, en células naturalmente no productoras, de una amplia gama de proteínas y péptidos útiles para la investigación y aplicaciones industriales (Porro & Mattanovich, 2004; Rosano et al., 2019). Mediante esta tecnología, a una proteína de interés se le puede adicionar una etiqueta de fusión o de afinidad. En principio, una etiqueta de afinidad facilita la identificación, modificación, aislamiento y purificación de proteínas recombinantes. Por otro parte, una proteína de fusión podría mejorar la solubilidad de la misma, el plegamiento nativo y la expresión, aumentando el rendimiento total, al mismo tiempo que se podría reducir la agregación y degradación. El uso de proteínas de fusión en combinación con etiquetas de afinidad incrementa las ventajas de las mismas (Bell et al., 2013). Sin embargo, en ocasiones es necesario eliminarlas al final del proceso de purificación. Esta eliminación se puede realizar mediante la incubación con proteasas específicas, pero con esto se introducen pasos adicionales aumentando los costos y la complejidad del sistema de purificación (Arnau et al., 2006).

Se han desarrollado alternativas para evitar la incubación con proteasas y una de ellas es el uso de etiquetas de afinidad autoclivables, basadas en inteínas (Miraula et al., 2015). Las inteínas son proteínas internas (o del inglés internal proteins) que se encuentran naturalmente dentro de una proteína huésped y que catalizan espontáneamente su propia escisión durante el proceso de *splicing* de proteínas. De este modo, la inteína se escinde a sí misma y cataliza la unión de las secuencias flanqueantes (llamadas exteínas) a través de un enlace peptídico (Figura I-1A y I-1B). Se han encontrado más de 600 inteínas en organismos unicelulares de los tres dominios de la vida (arqueas, bacterias y eucariotas) así como en varios genomas virales (Shah & Muir, 2014).

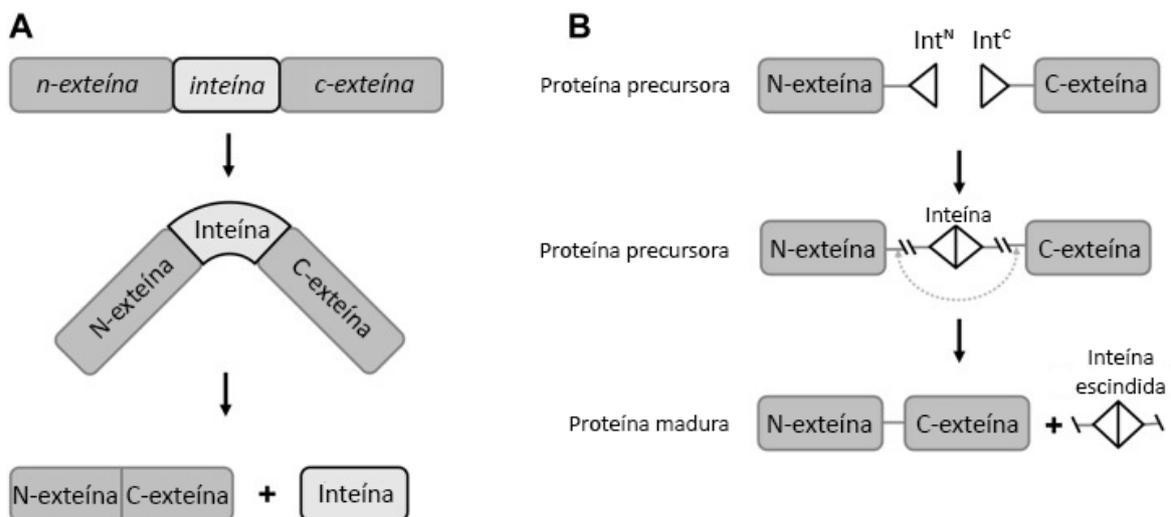


Figura I-1. Representación esquemática del *splicing* de una inteína. A) Traducción de la proteína precursora y su *splicing* en *cis*. B) *Trans-splicing* mediado por una *split* inteína. Figura adaptada de Wang et al. (2022).

La mayoría de las inteínas contienen en la parte central de su secuencia, un dominio endonucleasa que interviene en la propagación y movilidad de las mismas. Sin embargo, este dominio puede ser eliminado sin afectar la función de autoclivaje de la inteína (Iwai et al., 2017). Las inteínas existen naturalmente en tres configuraciones diferentes: (1) inteínas completas, donde la secuencia del dominio endonucleasa se encuentra entre los dominios de *splicing* (sitio catalítico) (**Figura I-2**); (2) mini inteínas, que carecen de dominio endonucleasa y contienen dominios de *splicing* contiguos; y (3) *split* inteínas, se transcriben y traducen como dos polipéptidos separados y cada uno está unido a una exteína (Nanda et al., 2020), estos dos fragmentos se vuelven a ensamblar en una sola estructura que funciona de manera similar a una inteína completa (Lin et al., 2013) (**Figura I-1B**). Cuando las inteínas se expresan como un sistema contiguo, como en el caso de las inteínas completas o mini inteínas, se conoce como *cis-splicing* (Saleh & Perler, 2006). Las *split* inteínas en cambio, que se expresan como dos genes separados, siguen un sistema de *trans-splicing* (Elleuche & Pöggeler, 2010) (**Figura I-1A y I-1B**).

En general, las inteínas conocidas comparten un bajo grado de similitud de secuencia y sólo tienen residuos conservados en los dominios de *splicing* N- y C-terminal. Estas regiones facilitan el inicio y la finalización de la actividad de *splicing*. El dominio N-terminal contiene los motivos estructurales A y B, mientras que los motivos F y G se encuentran en el dominio C-terminal (**Figura I-2**). La mayoría de las inteínas comienzan con Ser o Cys y terminan en His-Asn, o en His-Gln. Frecuentemente el primer aminoácido de la C-exteína es una Ser, Thr o Cys, pero el residuo que precede a la inteína en la N-exteína no es conservado. Sin embargo, está reportado que los residuos proximales al sitio de unión y clivaje de la inteína en ambas exteínas, N- y C-terminales, aceleran o atenúan el *splicing* de proteínas (Elleuche & Pöggeler, 2010) (**Figura I-2**).

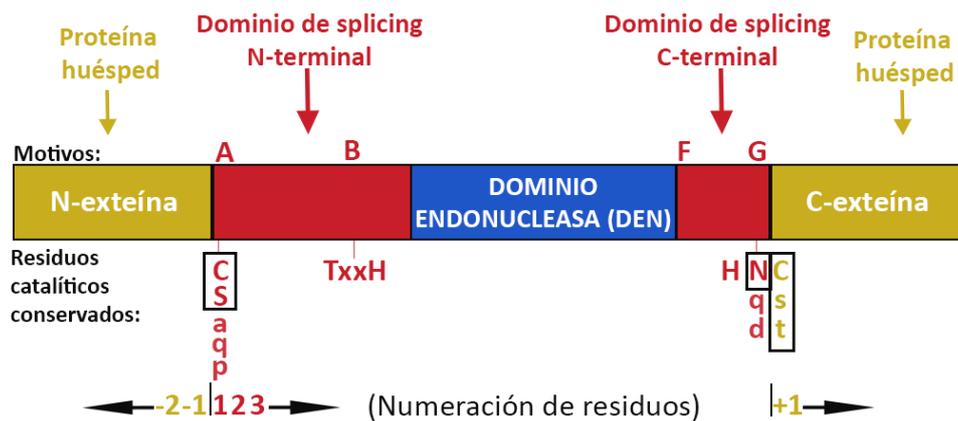


Figura I-2. Representación esquemática de la estructura de una inteína. El dominio de *splicing* de la inteína (cajas rojas) está formado por la asociación de las regiones que flanquean el dominio endonucleasa (DEN) (recuadro azul). Las mini inteínas tienen una pequeña secuencia *linker* en lugar de un DEN. Con letras rojas se identifican los motivos conservados que facilitan el *splicing* de proteínas. Los residuos catalíticos se identifican en rojo por debajo del esquema, en mayúscula los más conservados, en minúscula los menos conservados y con "x" se representa cualquier residuo. El sistema de numeración más común en las inteínas se muestra debajo de la figura, usando los signos menos y más para designar los residuos de la N-exteína y C-exteína, respectivamente. Figura adaptada de Saleh & Perler (2006).

La capacidad de autoclivaje de las inteínas en su versión completa y mini ha sido utilizada como herramienta para la purificación de proteínas recombinantes. Para esto una inteína se puede ubicar entre una etiqueta de afinidad [por ejemplo, dominio de unión a quitina (CDB), 6xhistidinas (His-tag), proteína de unión a maltosa (MBP)] y una proteína de interés. Para evitar el corte en la unión entre la etiqueta de afinidad y la inteína, se debe realizar una mutación específica en la secuencia de la inteína en dicho extremo. Mediante este proceso una proteína se puede eluir de una columna de afinidad, sin etiqueta, a través del autoclivaje de la inteína, y a la vez puede ser purificada en un solo paso. El clivaje de la inteína se puede inducir de varias maneras, más comúnmente por la adición de un grupo tiol [por ejemplo, ditioneitol (DTT)], o por cambio de pH y/o temperatura (Li, 2015; Miraula et al., 2015).

Muchos grupos de investigación han reportado aplicaciones exitosas con etiquetas basadas en inteínas para la purificación de proteínas y péptidos en *Escherichia coli*. Estas etiquetas autoclivables se basan en una combinación de etiquetas de afinidad (CBD, His-tag) o etiquetas de agregación con inteínas (*Mxe* GyrA, *Npu* DnaE, DI-CM inteína, *Ssp* DnaB) (Chen et al., 2019; Coolbaugh et al., 2017; Guan et al., 2013; Lu et al., 2011; Shi et al., 2013; Smith et al., 2012; Zhao et al., 2016). También se han desarrollado plásmidos comerciales basados en inteínas para la purificación de proteínas producidas en *E. coli*. Los sistemas IMPACT (New England Biolabs) incluyen vectores para la expresión de proteínas fusionadas con varias inteínas, incluida la inteína *Sce* VMA1 en su versión completa (clivaje inducible por tiol) y la mini inteína *Ssp* DnaB (clivaje inducible por cambio de pH y temperatura). La bibliografía en este tema es muy heterogénea. En algunos casos sólo se analizan las inteínas con proteínas modelo (como por ejemplo la GFP), en otros casos se agregan algunos aminoácidos extras para garantizar el correcto clivaje de la inteína, o se fusiona la inteína en el extremo C-terminal de la proteína de interés y para eliminar la metionina inicial se agrega un sitio que debe ser reconocido por una proteasa. Por lo tanto, aunque se utilizan inteínas para eliminar la etiqueta de afinidad, muchas proteínas recombinantes quedan con aminoácidos extras.

La mini inteína *Ssp* DnaX es una inteína autoclivable, no comercializada, que ha sido caracterizada como una proteína versátil ya que muestra una fuerte actividad de *splicing* (Lin et al., 2013). Además, la mayoría de las inteínas no funcionan cuando un residuo Pro se ubica en las posiciones -1 o +2 respecto del sitio de corte; sin embargo, la mini inteína *Ssp* DnaX puede realizar el clivaje y posterior unión de proteínas con Pro en la posición +2 o en las posiciones -1 y +2, respectivamente (X. Zhang et al., 2019).

Un potencial problema de los sistemas de purificación basados en inteínas, es el clivaje espontáneo de la inteína, durante las etapas de expresión y purificación. Además, los aminoácidos que flanquean el sitio de corte pueden afectar la eficiencia del clivaje, ya sea reduciendo el clivaje *in vitro*, o incrementando la tasa de clivaje espontáneo *in vivo*. Estos problemas pueden reducir en gran medida el rendimiento final. Por esta razón se han

publicado listas de aminoácidos recomendados para los extremos N- y C-terminales de algunas inteínas específicas (Cheriyán et al., 2013; Iwai et al., 2006; Xu et al., 2000).

E. coli es un organismo procariota ampliamente estudiado y es comúnmente utilizado para la producción de proteínas recombinantes. En el caso de proteínas que presentan puentes disulfuro, la expresión en *E. coli* se dificulta si los mismos son necesarios para el correcto plegamiento y/o actividad enzimática de la proteína de interés. La presencia de varias reductasas y agentes reductores (por ejemplo, glutatión) en el citoplasma de *E. coli* tiende a interferir con la formación del puente disulfuro (Berkmen, 2012). Una estrategia para la expresión de proteínas que contienen puentes disulfuro es expresarlas en el citoplasma en forma de cuerpos de inclusión, los cuales posteriormente son solubilizados y replegados *in vitro* (Vallejo & Rinas, 2004). También se pueden utilizar cepas específicamente diseñadas para la expresión citoplasmática de tales proteínas basadas en la interrupción de genes de la reductasa citoplasmática. En algunas cepas comerciales como Origami (Novagen) y Shuffle (Lobstein et al., 2012) se han eliminado los genes correspondientes a la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y glutatión reductasa (*gor*). Sin embargo, el rendimiento de proteínas recombinantes conteniendo puentes disulfuro expresadas en estas cepas es comúnmente bajo, por lo que es necesario utilizar estrategias adicionales. Tales proteínas también pueden ser expresadas en el citoplasma de *E. coli* empleando el sistema CyDisCo, el cual consiste en co-expresar un catalizador para formación de puentes disulfuro (Gaciarz et al., 2017).

Alternativamente, se puede secretar una proteína que necesita puentes disulfuro, al ambiente oxidante del periplasma en cepas normales de *E. coli*. Este compartimento contiene enzimas que catalizan la formación y corrección de los puentes disulfuro, como la “Dsb” (por sus siglas en inglés *disulfide bond*) (Berkmen, 2012). Aunque se han descrito varios péptidos señal, la forma más eficaz de encontrar uno óptimo, es examinar su capacidad de translocar cada proteína recombinante (Selas Castiñeiras et al., 2018; W. Zhang et al., 2018).

En el presente trabajo de Tesis, se diseñó e implementó un nuevo sistema de expresión de proteínas en el periplasma de *E. coli*. El sistema permite, mediante un solo paso de cromatografía de afinidad, purificar las proteínas recombinantes de interés, las cuales además de quedar libres de etiquetas y de aminoácidos extras, contienen puentes disulfuro.

En este desarrollo se utilizó como proteína modelo la hormona del crecimiento humana (hGH), ya que, al ser utilizada para terapia en humanos, no puede contener etiquetas o aminoácidos extras en su estructura. La hGH es un polipéptido de cadena sencilla que contiene dos puentes disulfuro. La forma nativa y madura de la hGH deriva de un precursor de 217 aminoácidos, que luego de la eliminación del péptido señal, deja una secuencia de 191 aminoácidos y un residuo fenilalanina (Phe) como primer aminoácido (**Figura I-3**). Estas características hacen de la hGH una proteína modelo útil para el desarrollo de sistemas de expresión y purificación en *E. coli* de proteínas recombinantes que

contengan: un aminoácido N-terminal que no sea metionina (Met) y el requisito de no poseer aminoácidos N- o C-terminales, extras, luego de su purificación.

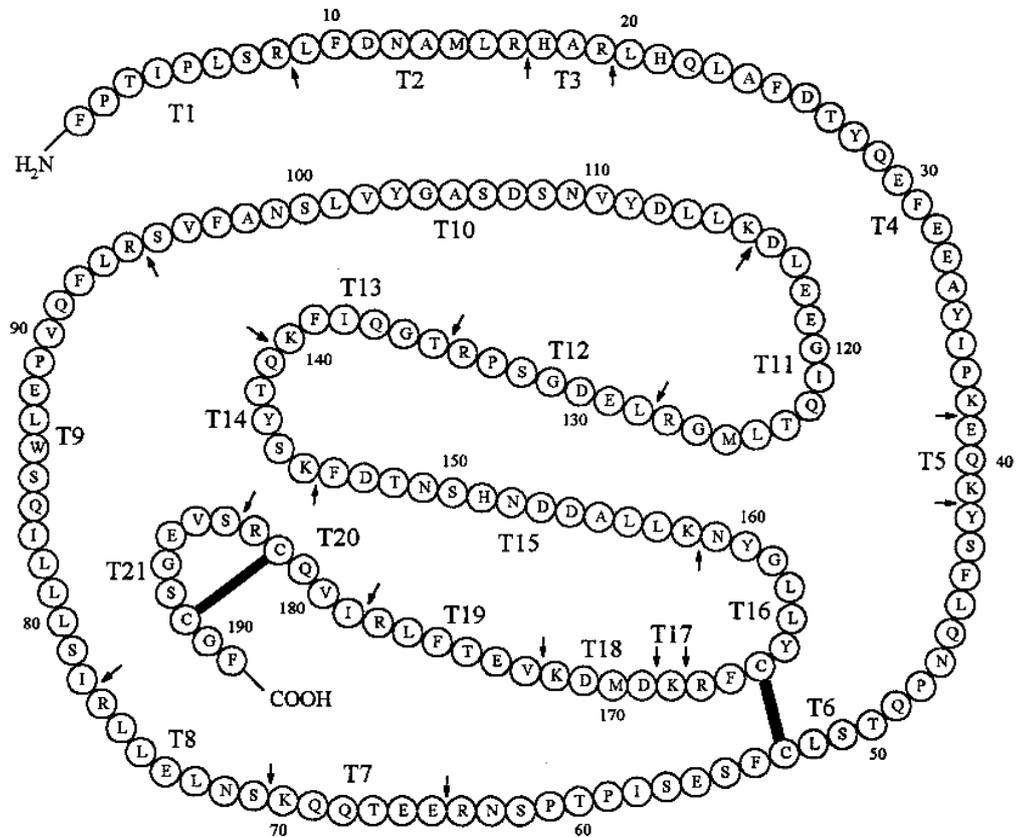


Figura I-3. Representación de la secuencia de la hormona del crecimiento humana conteniendo 191 aa y comenzando con su primer aminoácido natural, Phe. Se esquematiza la unión de las cisteínas que forman los dos puentes disulfuro (líneas negras). Se incluyen también los sitios en los que la tripsina teóricamente escindirá la proteína (indicados por flechas) y los fragmentos trípticos resultantes (indicados por T1, T2,... T21) figura extraída de Lei et al. (1998).

I.2. RESULTADOS

I.2.1. Expresión y purificación de la rhGH citoplasmática con la etiqueta de afinidad autoclivable VMA1

Se analizó la capacidad de la inteína *Sce* VMA1 (en un vector comercial), para producir una hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) soluble y correctamente plegada, al fusionarse a la región N-terminal de la misma. El plásmido Ptyb12-rhGH construido (ver Materiales y Métodos, sección I.4.2) contiene las secuencias de la etiqueta de afinidad CBD, de la inteína *Sce* VMA1 (VMA1) y de la hGH clonadas en marco. Luego de la expresión, este plásmido generó la proteína recombinante de fusión CBD-VMA1-rhGH (**Figura I-4A**). En esta proteína de fusión, la rhGH comienza con Phe (el primer aminoácido que sigue a su péptido señal natural), ubicado justo después del sitio de corte de la inteína *Sce* VMA1.

La expresión de la proteína CBD-VMA1-rhGH se indujo durante toda la noche a 22 °C. Bajo estas condiciones experimentales, la proteína de fusión se observó principalmente en la fracción soluble después de la lisis celular (**Figura I-4B**). El extracto soluble conteniendo la proteína recombinante de fusión, se cargó en una columna de quitina y se lavó para eliminar todo el material no unido a la columna de afinidad. Posteriormente, se indujo la actividad de autoclivaje de la inteína *Sce* VMA1 mediante la adición de DTT, donde la rhGH fue liberada sin aminoácidos extras (**Figura I-4A y 4B**). Teniendo en cuenta que la rhGH posee dos puentes disulfuro internos, los mismos se analizaron mediante HPLC. La rhGH citoplasmática purificada y una rhGH comercial, fueron digeridas con tripsina y analizadas por HPLC, en paralelo (**Figura I-4C**). El perfil de HPLC de los péptidos trípticos reveló que todos los péptidos de rhGH esperados estaban presentes en ambas proteínas, tanto en la rhGH comercial, como en la expresada y purificada en nuestro laboratorio. En las dos muestras de rhGH se observaron similares cantidades relativas de los fragmentos trípticos T20-T21, correspondientes a los péptidos T20 y T21 unidos por un puente disulfuro (Cys182-Cys189) (**Figura I-3**). Los fragmentos trípticos fueron nombrados como T1, T2, ... T21 como en Lei et al. (1998). Sin embargo, nuestra proteína rhGH citoplasmática purificada, tiene una cantidad relativa menor del péptido tríptico T6-T16, correspondiente a los péptidos T6 y T16 unidos por un puente disulfuro (Cys53-Cys165) (**Figura I-4C**, paneles superiores).

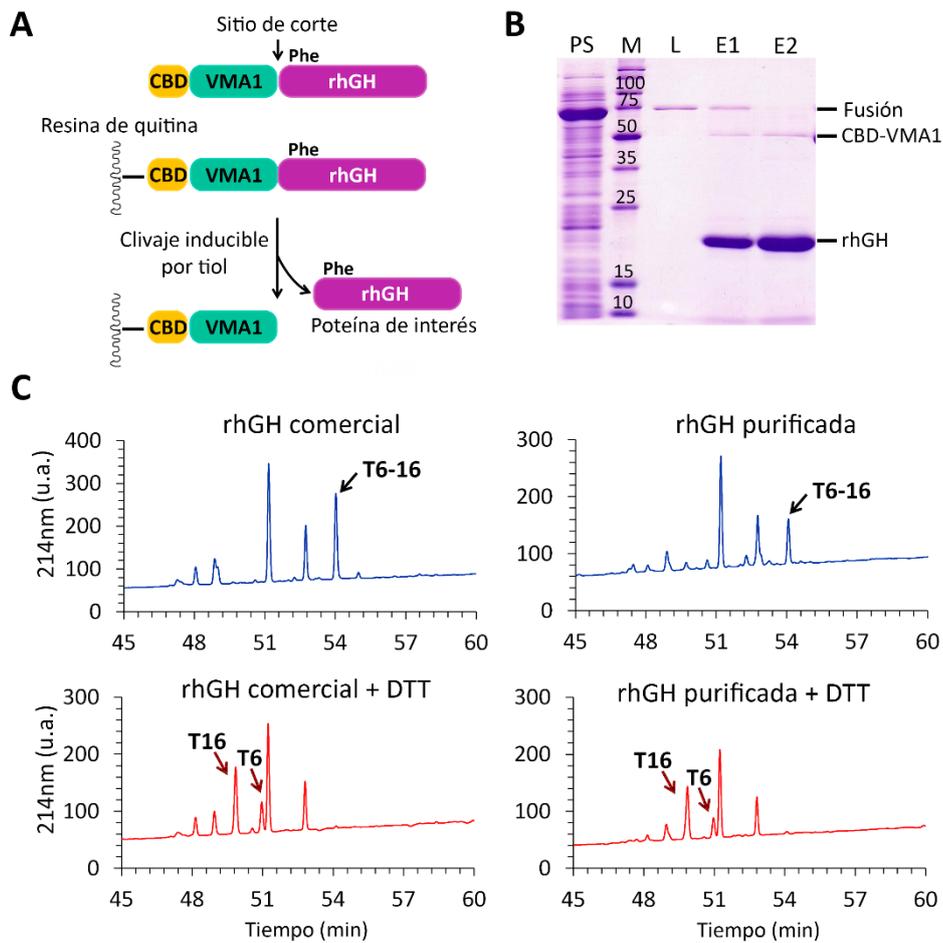


Figura I-4. Expresión, purificación y análisis de la rhGH citoplasmática, utilizando la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal VMA1. (A) Esquema de la proteína de fusión y del proceso de purificación. (B) Expresión y purificación de la rhGH. Carril PS: fracción de proteína soluble después de la lisis celular. Carril M: marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler Unstained Protein Ladder; Thermo Fisher). Carril L: último lavado antes de la elución. Carriles E1, E2: primer y segundo eluido de la rhGH, luego del cese del flujo de la columna e inducción de la actividad de autoclivaje de la inteína, con DTT a temperatura ambiente, durante 16 h. (C) Análisis por HPLC de la rhGH purificada después de la digestión con tripsina. Mapa tríptico parcial, de las muestras de la rhGH comercial y la rhGH citoplasmática purificada, en sus estados nativos (paneles superiores) y reducidos (paneles inferiores). Sólo se muestran los picos eluidos en el rango de 45 a 60 min. Las flechas en los paneles superiores indican el fragmento tríptico T6-T16, correspondiente a los péptidos unidos por un puente disulfuro (Cys53-Cys165). Las flechas en paneles inferiores indican los fragmentos trípticos, T6 y T16, detectados después de la reducción del puente disulfuro (Cys53-Cys165). Se muestra un mapa tríptico representativo para cada condición. Los fragmentos trípticos fueron nombrados como T1, T2, T21, como en Lei et al. (1998).

La identidad del pico correspondiente a los péptidos unidos T6-T16, que mostraba una cantidad relativa menor en la muestra correspondiente a la rhGH purificada, se confirmó incubando con agente reductor (DTT) a las muestras de rhGH digeridas con tripsina y luego realizando un nuevo análisis HPLC. El pico correspondiente a los péptidos unidos por un puente disulfuro desapareció y dos nuevos picos aparecieron, los cuales corresponden a los péptidos T6 y T16 liberados (**Figura I-4C**, paneles inferiores), confirmando la identidad del pico inicial y la deficiencia del puente disulfuro en la proteína rhGH citoplasmática purificada. La expresión de la rhGH dio resultados similares tanto en las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) como Origami (ver Materiales y Métodos, sección I.4.2). El puente disulfuro en menor nivel, de la rhGH citosólica purificada, puede ser el resultado del uso de un agente reductor para inducir la actividad de corte de la inteína *Sce* VMA1. Por lo tanto, si bien este sistema experimental facilitó la expresión y purificación de una cantidad considerable de rhGH soluble (que comienza con un residuo Phe y carece de aminoácidos extras, tanto en el N- o C-terminal), fue parcialmente ineficiente debido a que el puente disulfuro T6-T16 no está completamente establecido en la rhGH purificada.

I.2.2. Expresión y purificación de una rhGH citoplasmática con etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaX o DnaB

Se analizaron dos inteínas con actividad de autoclivaje inducida por cambio de pH y temperatura. Estas inteínas fueron fusionadas al N-terminal de la rhGH para evaluar su capacidad de producir la proteína recombinante citoplasmática soluble, libre de aminoácidos extras y con una adecuada formación de los puentes disulfuro.

El plásmido pET25b-DnaX-rhGH (ver Materiales y Métodos, sección I.4.2) se construyó con las regiones codificantes del CBD, la mini inteína *Ssp* DnaX (no comercial) y la hGH clonadas en marco. Luego de la expresión, este plásmido generó la proteína recombinante de fusión His-tag-CBD-DnaX-rhGH (**Figura I-5A**). En esta proteína de fusión, la rhGH comienza con su aminoácido natural Phe, localizado justo después del sitio de corte de la mini inteína *Ssp* DnaX. La expresión de esta proteína se indujo toda la noche a 22°C. Bajo estas condiciones experimentales, la inteína DnaX se observa completamente autoclivada en la fracción soluble, luego de la lisis celular, por lo que la rhGH no pudo ser purificada y analizada (**Figura I-5A**). Por lo tanto, se analizó la misma construcción, pero reemplazando la mini inteína *Ssp* DnaX con la mini inteína *Ssp* DnaB (comercial).

El plásmido pTWIN1-rhGH (ver sección I.4.2 de Materiales y Métodos) se construyó con las regiones codificantes del CBD, la mini inteína *Ssp* DnaB y la hGH clonadas en marco. Luego de la expresión, este plásmido generó la proteína recombinante de fusión CBD-DnaB-rhGH (**Figura I-5B**). En esta proteína de fusión, la rhGH comienza con su aminoácido natural Phe, localizado justo después del sitio de corte de la inteína. La expresión de esta proteína se indujo toda la noche a 22°C. Bajo estas condiciones experimentales, la proteína quimérica se observó principalmente en la fracción soluble luego de la lisis celular (**Figura I-5C**). Esta

proteína se unió eficientemente a la columna de afinidad de quitina, y la actividad de corte de la mini inteína *Ssp DnaB* se indujo por un cambio de pH y temperatura (ver sección I.4.5, de Materiales y Métodos). Sin embargo, la proteína rhGH no fue clivada, quedando como proteína de fusión unida a columna de quitina (**Figura I-5C**).

Se ha descrito que la actividad de corte C-terminal de la mini inteína *Ssp DnaB*, se ve afectada por los aminoácidos flanqueantes al sitio de corte (sistema IMPACT; NEB). Por esta razón, el primer aminoácido natural de la hGH, Phe, podría afectar la actividad de corte de la mini inteína *Ssp DnaB*. Para esto, se generó el plásmido pTWIN1-M-rhGH, el cual luego de la expresión produjo la proteína recombinante CBD-DnaB-M-rhGH (**Figura I-5B**). La rhGH en esta proteína de fusión, tiene una Met adicional antes de la primera Phe natural, justo después del sitio de corte de la inteína. La Met como aminoácido contiguo al sitio de corte, está recomendada para un clivaje eficiente de la mini inteína *Ssp DnaB* (sistema IMPACT). A diferencia de la rhGH nativa, la proteína M-rhGH se liberó después de la inducción de la actividad de corte de la mini inteína *Ssp DnaB*, mediante cambio de pH y temperatura (**Figura I-5B y 5D**). Sin embargo, un porcentaje importante de la rhGH permaneció unida a la columna como proteína de fusión (**Figura I-5D**).

Para evaluar si la actividad de corte de la inteína *Ssp DnaB* podía verse afectada por la unión de las proteínas quiméricas a la columna de quitina, se examinó la actividad de corte de las dos proteínas en solución, es decir libre de resina. Nuevamente, la mini inteína *Ssp DnaB* presente en la proteína de fusión CBD-DnaB-M-rhGH, fue capaz de liberar la proteína M-rhGH mediante el autoclivaje (**Figura I-5E**); sin embargo, la proteína de fusión CBD-DnaB-rhGH, permaneció esencialmente sin modificar y la rhGH no fue detectada. Este análisis demuestra, por lo tanto, que la mini inteína *Ssp DnaB* no puede ser utilizada para producir una proteína recombinante libre de etiqueta, cuando Phe es el primer aminoácido de la proteína de interés, o al menos cuando la proteína de interés es rhGH.

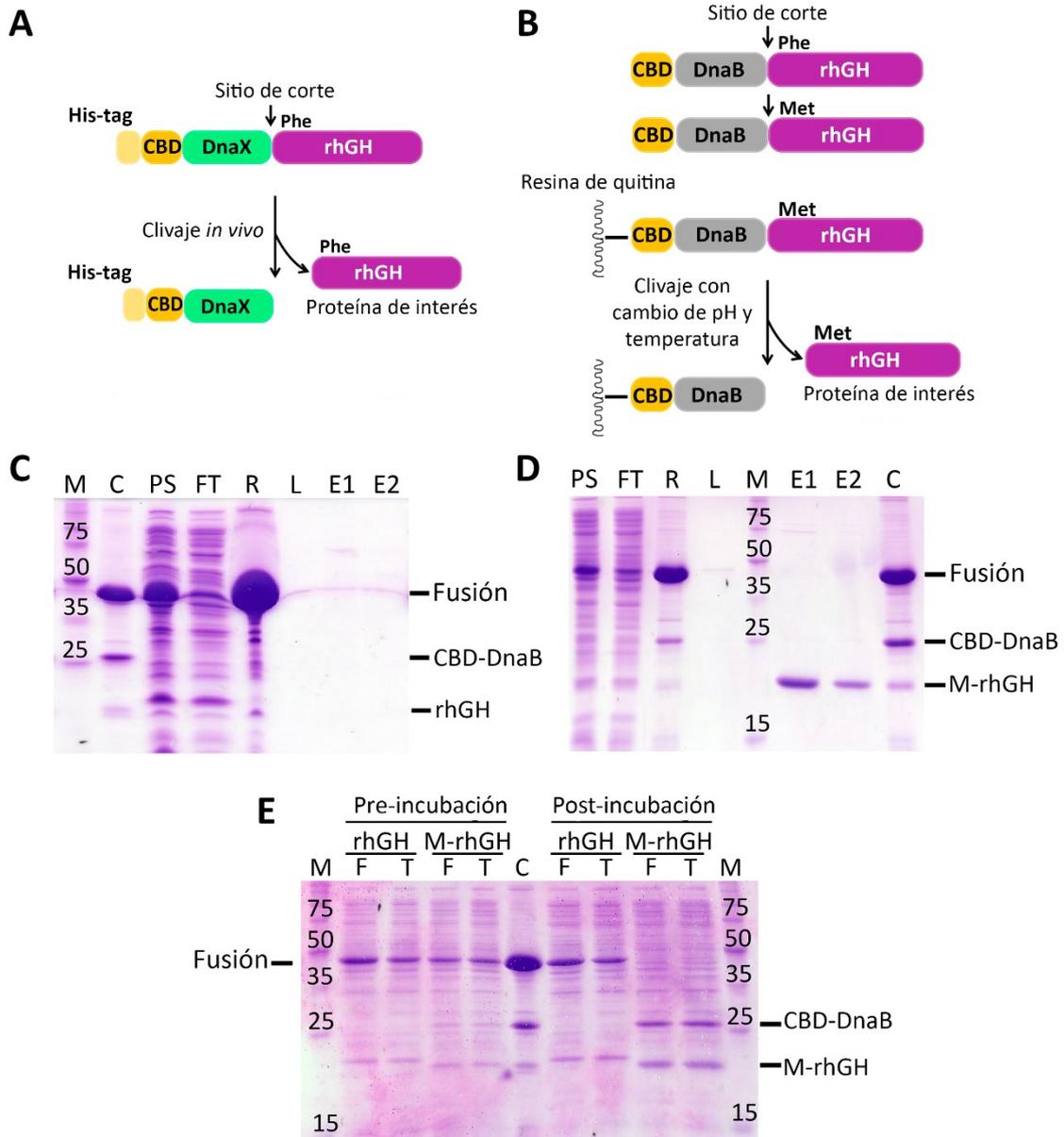


Figura I-5. Expresión y purificación de la rhGH citoplásmica con etiqueta de afinidad N-terminal, DnaX o DnaB, autoescindible. (A) Esquema de la proteína de fusión CBD-DnaX-rhGH y de su expresión, donde la proteína química sufre clivaje *in vivo*. (B) Esquemas de las proteínas de fusión CBD-DnaB-rhGH y CBD-DnaB-M-rhGH, y su proceso de purificación. (C, D) Expresión y purificación de rhGH y M-rhGH. Carril M: marcador de peso molecular de proteínas. Carril C: mezcla de las proteínas esperadas (CBD-DnaB-rhGH, CBD-DnaB, rhGH) para el control de la migración. Carril PS: fracción de proteína soluble luego de la lisis celular. Carril FT: fracción de proteínas no retenidas en la columna de quitina. Carril R: proteína unida a la resina de quitina. Carril L: último lavado antes de la elución. Carriles E1 y E2: primer y segundo eluido de rhGH, luego del cese del flujo de la columna e inducción de la actividad de autoclivaje de la inteína, a temperatura ambiente y pH 6,5 durante 16 hs. (E) Actividad de autoescisión de la DnaB en solución (sin resina). Las proteínas de fusión se incubaron en buffer fosfato o tris- HCl (pH 6,5) a temperatura ambiente durante 16 hs, y posteriormente se analizaron mediante análisis SDS-PAGE antes y después de la incubación. Carril M: marcador de peso molecular de proteínas. Carriles F: proteínas en buffer fosfato. Carriles T: proteínas en buffer Tris-HCl.

I.2.3. Expresión y purificación de una rhGH periplásmica con etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal DnaX o DnaB

Teniendo en cuenta que las inteínas N-terminales analizadas (VMA1, DnaX y DnaB), no permitieron la expresión y posterior purificación en forma adecuada de la rhGH desde el citoplasma, posteriormente, evaluamos el posible uso de un sistema de expresión y purificación de proteínas alternativo. Este sistema combina el envío de la proteína de interés al espacio periplásmico, con la fusión de la misma mediante su C-terminal a una etiqueta de afinidad autoclivable e inducible por cambio de pH y temperatura. Cabe recordar que en el espacio periplásmico de *E. coli* se favorece, además, la formación de puentes disulfuro.

Para dirigir la expresión de la proteína quimérica al espacio periplásmico, se agregó un péptido señal al comienzo de la misma. Además, el primer aminoácido natural de la rhGH, Phe, se mantuvo justo después del sitio de corte del péptido señal. De esta manera, el péptido señal se elimina naturalmente en el espacio periplásmico, dejando el residuo Phe como primer aminoácido de la rhGH.

Los plásmidos pET25b-DsbA-rhGH-DnaB y pET25b-DsbA-rhGH-DnaX (ver sección I.4.2, de Materiales y Métodos) fueron construidos con las secuencias codificantes del péptido señal periplásmico DsbA, de la hGH, la mini inteína *Ssp* DnaB o *Ssp* DnaX (respectivamente), el CBD y la etiqueta His (His-tag) clonadas en marco. Estos plásmidos generaron las proteínas recombinantes de fusión, DsbA-rhGH-DnaB-CBD-His-tag y DsbA-rhGH-DnaX-CBD-His-tag (**Figura I-6A**), las cuáles pierden el péptido señal después de su translocación al compartimento periplásmico. La expresión de estas proteínas recombinantes se indujo durante toda la noche a 22 °C. La proteína rhGH-DnaB-CBD-His-tag mostró una baja expresión, mientras que la proteína rhGH-DnaX-CBD-His-tag se expresó eficientemente. Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales, alrededor de un 40 % de la proteína quimérica rhGH-DnaX-CBD-His-tag, sufrió el clivaje *in vivo* de la mini inteína DnaX. Cabe destacar que esta proteína quimérica fue expresada utilizando medio LB sin bufferizar. Teniendo en cuenta que, la actividad de corte de la inteína DnaX se activa con un cambio de pH desde 8,5 a 6, analizamos la posibilidad de reducir el clivaje de la inteína *in vivo*, mediante el cultivo en medio LB bufferizado a un pH más alcalino.

Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pET25b-DsbA-rhGH-DnaX, se cultivaron a 37 °C en medio LB bufferizado, con buffer Tris-HCl o buffer fosfato de potasio, a diferentes pH hasta alcanzar una OD₆₀₀ 0,5-0,6. Luego, la expresión de proteína recombinante de fusión se indujo durante toda la noche a 22 °C. Las muestras de extracto total de proteína se analizaron mediante ensayos de *Western blot* utilizando anticuerpo anti-His-tag (**Figura I-6B**). Se observó que a medida que el pH del medio LB bufferizado aumenta, disminuye la cantidad total de proteína recombinante escindida *in vivo* (**Figura I-6B y I-6C**), y aumenta notablemente la cantidad total de proteína recombinante expresada (**Figura I-6B y I-6D**). El máximo nivel de expresión de la rhGH-DnaX-CBD-His-tag, se observó en LB bufferizado a pH 8 con buffer Tris-HCl (**Figura I-6B y I-6D**), y fue más del doble que los niveles

observados en cualquiera de las otras condiciones. Resultados preliminares mostraron que, la rhGH podía purificarse eficientemente a partir de la proteína de fusión obtenida de los cultivos a pH 8.

Teniendo en cuenta que nuestro objetivo es el desarrollo de sistemas de expresión y purificación de proteínas recombinantes de interés industrial, decidimos evaluar nuestro nuevo sistema de expresión (rhGH-DnaX-CBD-His-tag / LB a pH 8 con buffer Tris-HCl) en cultivo en un biorreactor, una condición que normalmente se utiliza para la producción de proteínas recombinantes, a una mayor escala. La proteína recombinante periplásmica rhGH-DnaX-CBD-His-tag, fue sintetizada mediante un cultivo en *batch* de 2 L, en el biorreactor Biostat A con medio LB bufferizado a pH 8 con Tris-HCl, y con el control y registro de varios parámetros en el tiempo. La expresión de la proteína recombinante se indujo durante toda la noche a 20 °C (ver sección I.4.7, de Materiales y Métodos). La expresión se analizó a lo largo del tiempo durante 18 h a intervalos de 2 h. La proteína recombinante se sintetizó eficientemente bajo estas condiciones de expresión, alcanzando el nivel máximo a las 18 h post inducción (**Figura I-6E**). Una pequeña proporción de la proteína sufrió clivaje *in vivo*, siendo entre un ~6% y 12% del total de proteína producida a las 16 y 18 h, respectivamente (**Figura I-6E**).

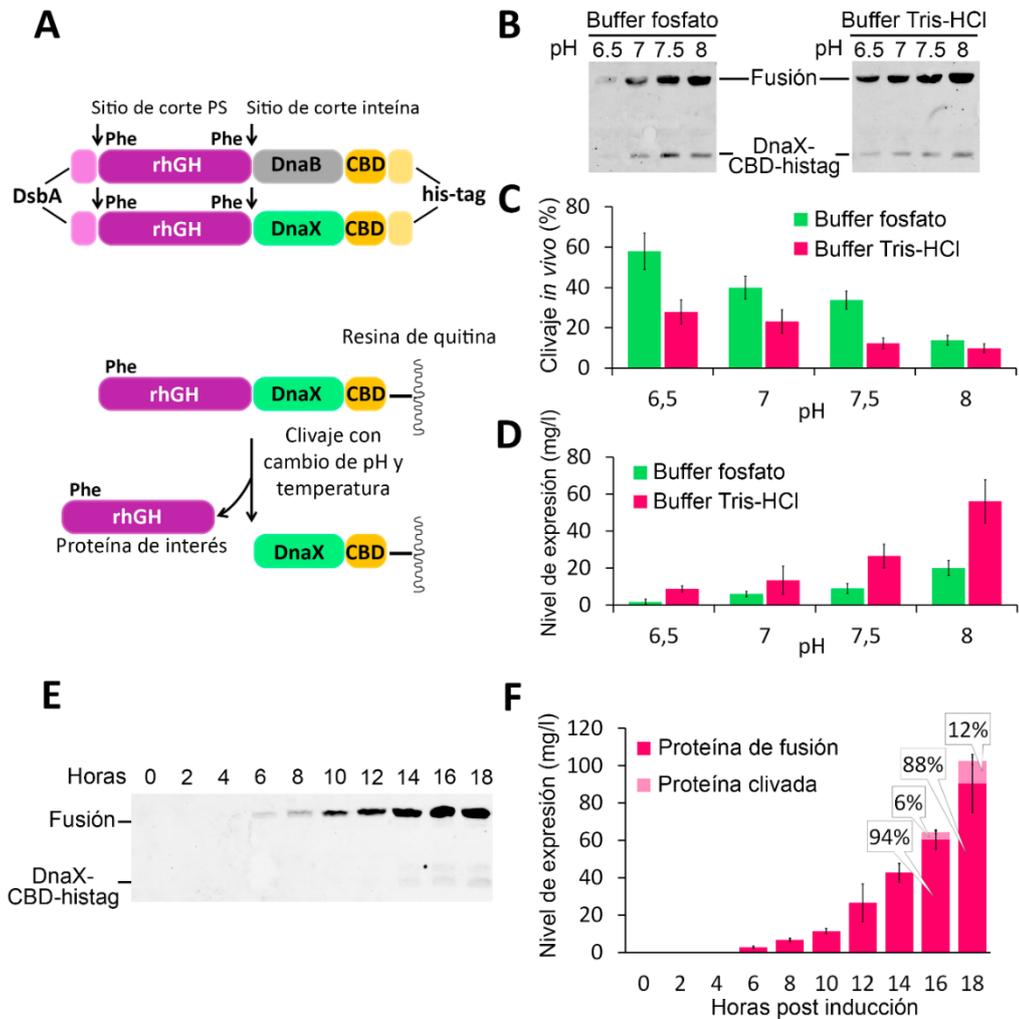


Figura I-6. Análisis de la expresión de la proteína rhGH periplásmica con la etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal, DnaB o DnaX. (A) Se muestran las proteínas de fusión DsbA-rhGH-DnaB-CBD y DsbA-rhGH-DnaX-CBD, y el proceso de purificación usando la etiqueta de afinidad autoclivable DnaX. (B) Efectos del pH sobre el clivaje *in vivo* de la inteína DnaX y sobre el nivel de expresión de la proteína de fusión DsbA-rhGH-DnaX-CBD. Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron en medio LB, preparado con buffer Tris-HCl o buffer fosfato de potasio, a diferentes valores de pH. Las muestras de extracto total de proteína se analizaron mediante ensayo *Western blot* usando anticuerpo anti-His-tag. Se muestra un ensayo *Western blot* representativo. (C, D) Las intensidades de banda de cinco ensayos *Western blot*, se cuantificaron utilizando Image Lab Software, y luego se determinó y graficó el porcentaje de clivaje *in vivo* (C) y la cantidad de proteína de fusión no clivada (D). (E) Expresión de la proteína rhGH periplásmica, con la etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal DnaX, en un biorreactor de 2 L en condiciones de crecimiento optimizadas. Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron a 37 °C en medio LB con buffer Tris-HCl, pH 8, hasta que la DO₆₀₀ alcanzó un valor de 0,5-0,6. La expresión de la proteína recombinante quimérica se indujo durante toda la noche a 20 °C, y se tomaron muestras de cultivo cada 2 h. Las muestras de extracto total de proteína se analizaron mediante ensayos de *Western blot* usando anticuerpo anti-His-tag. Se muestra un ensayo *Western blot* representativo. (F) Se cuantificaron y graficaron las intensidades de banda de siete ensayos *Western blot*.

La rhGH producida mediante cultivo *batch* en biorreactor, se purificó y caracterizó. El extracto soluble total, conteniendo la proteína recombinante rhGH-DnaX-CBD-His-tag acumulada a las 18 h post inducción, se cargó en una columna de quitina. La actividad de corte de la mini inteína DnaX se indujo por cambio de pH, incubando la columna con buffer de clivaje (pH 6,5; ver **Tabla I-1**) a temperatura ambiente, durante toda la noche. La proteína rhGH se liberó con alta pureza (**Figura I-7A**) y la eficiencia de clivaje *in vitro* de la mini inteína DnaX a TA, fue de un ~92 %.

Luego, la rhGH periplásmica purificada y una rhGH comercial control, se caracterizaron mediante espectrometría de masas (MS), y por digestión con tripsina y posterior análisis MALDI-TOF MS. El análisis de MS reveló un pico correspondiente al esperado para la rhGH, de 22,125 kDa y 191 aa, con dos puentes disulfuro internos (no mostrado). El análisis MALDI-TOF MS reveló los péptidos internos de la rhGH, corroborando que el péptido N-terminal de la proteína rhGH estaba libre del péptido señal, tanto en la proteína purificada como en la comercial (**Figura I-7B**).

No se detectó ningún pico para el péptido correspondiente al N-terminal de la proteína rhGH unido al péptido señal. Este resultado confirma la correcta remoción del péptido señal, en el N-terminal de la proteína. El análisis MALDI-TOF MS de los péptidos trípticos con y sin reductor, permitió la identificación de los dos puentes disulfuro presentes en la rhGH (T6-T16 y T20-T21) (**Figura I-7C**). Para ambas proteínas, se evidenció un pico correspondiente al puente disulfuro T6-T16, en condiciones no reductoras, el cual no fue detectado en condiciones reductoras (**Figura I-7C**, primera columna). Por otro lado, los picos de los péptidos individuales correspondientes a T6 y T16, estaban casi ausentes en condiciones no reductoras, pero aparecen en condiciones reductoras, como era esperado (**Figura I-7C**, segunda y tercera columna). De manera similar, el péptido T20-T21 se observó bajo condiciones no reductoras, pero casi ausente en condiciones reductoras, mientras que el péptido T20 se observó en condiciones reductoras, pero casi ausente en condiciones no reductoras (cuarta y quinta columna). El péptido T21 no fue detectado, presumiblemente porque es el péptido final y no tiene aminoácidos básicos. Las cantidades relativas internas de los picos, correspondientes a los péptidos de los dos puentes disulfuro unidos, fueron similares en nuestra rhGH periplásmica purificada como en la rhGH comercial, lo que indica que ambos puentes disulfuro estaban correctamente formados en la rhGH purificada. La correcta remoción de la inteína DnaX del C-terminal de la proteína, fue confirmada por la presencia y abundancia relativa del péptido T20-T21 en la rhGH purificada.

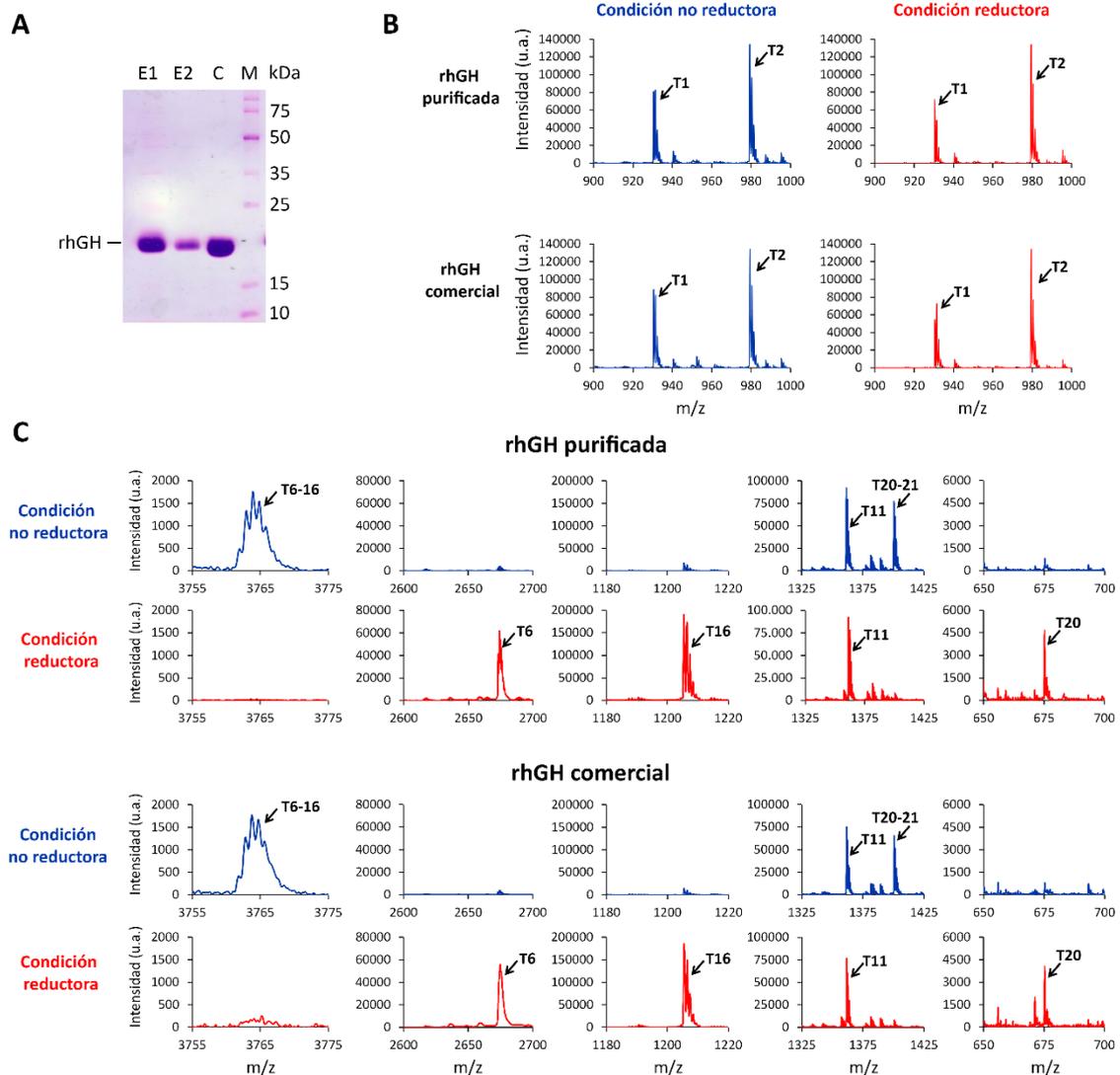


Figura I-7. Purificación y análisis de proteína rhGH periplásmica con la etiqueta de afinidad autoclivable C-terminal DnaX. (A) rhGH purificada. Carriles E1 y E2: primer y segundo eluido de la rhGH, después del cese del flujo de la columna y la inducción de la actividad de autoclivaje de la inteína, a temperatura ambiente y pH 6,5, durante 16 h. Carril C: la rhGH comercial. Carril M: marcador de peso molecular de proteínas. (B, C) Digestión con tripsina y posterior análisis MALDI-TOF MS de la proteína rhGH periplásmica purificada y la rhGH comercial, en condiciones reductoras y no reductoras. Los fragmentos trípticos se nombran como T1, T2, ..., T21, como en Lei et al. (Lei et al., 1998). B: región m/z 900-1000. El pico en 930,4 corresponde al péptido T1 (aa's 1-8), y el pico en 979,4 corresponde al péptido T2 (aa's 9-16). C: región m/z 3755-3775. El pico en 3761,9, corresponde a los péptidos T6-T16 (puente disulfuro entre la Cys53 y Cys165). Este pico casi desaparece en condiciones reductoras para ambas proteínas (primera columna). En las columnas 2 y 3 se muestra la aparición de los péptidos T6 y T16, bajo la condición reductora. El pico en 2673,1 en la columna 2, de la condición reductora, corresponde al péptido T6 (aa 42-64), y el pico en 1205,4 en la columna 3, de la condición reductora, corresponde al péptido T16 (aa 159-167). La región m/z 1325-1425, se muestra en la columna 4. El pico en 1400,5 corresponde a los péptidos T20-T21 (puentes disulfuro entre la Cys182 y Cys189). Este pico casi desaparece en condiciones reductoras para ambas proteínas (cuarta columna). El pico en 1361,5 corresponde a péptido T11 (aa 116-127) y está presente, tanto en condiciones no reductoras como reductoras. La aparición del péptido T20, en condiciones reductoras, se muestra en la columna 5. El pico en 675,2 corresponde al péptido T20 (aa 179-183).

I.3. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta nuestro primer objetivo, desarrollamos e implementamos una nueva etiqueta de afinidad autoclivable, basada en la mini inteína DnaX, para la purificación por afinidad en un solo paso, de proteínas recombinantes expresadas en el espacio periplásmico de *E. coli*. Esta tecnología, además es útil, para proteínas de interés que tengan puentes disulfuro, y permite que la proteína recombinante purificada, se obtenga libre de etiquetas y sin aminoácidos adicionales.

Como proteína modelo, utilizamos la hGH, la cual es una proteína terapéutica, no glicosilada, que comienza con Phe en el extremo N-terminal, y contiene dos puentes disulfuro. En *E. coli* se han desarrollado varios sistemas de expresión de proteínas recombinantes para la hGH, o se han analizado utilizando la hGH como proteína modelo. Sin embargo, en estos sistemas, la rhGH ha sido expresada en cuerpos de inclusión, o en forma soluble conteniendo formilmetionina (fMet) en el extremo N-terminal, o una etiqueta (lo que implica la posterior incubación con una proteasa y pasos de purificación adicionales) (Aramvash et al., 2018; Deutscher et al., 2014; Gaciarz et al., 2017; Kormanová et al., 2020; Levarski et al., 2014; Patra et al., 2000; Starokadomskyy et al., 2008; Upadhyay et al., 2016; Wojtowicz-Krawiec et al., 2014; Zhou et al., 2020).

Con el objeto de superar estos obstáculos, generamos y analizamos diferentes etiquetas, basadas en inteínas, fusionadas con el extremo N-terminal de la rhGH. Aunque estas etiquetas permitieron la expresión de la rhGH citoplásmica, la estrategia no funcionó ya que: a) la rhGH purificada era parcialmente deficiente en uno de los puentes disulfuro (presumiblemente debido al agente reductor requerido para inducir la actividad de corte de la inteína *Sce* VMA1), b) la proteína de fusión *Ssp* DnaX-hGH se clivó completamente en el citoplasma de *E. coli*, y c) la inteína DnaB no pudo autoescindir-se después de la inducción del clivaje. Una causa probable de esto último, es un efecto inhibitorio de la Phe (el primer aa de la hGH, ubicado inmediatamente después del sitio de corte de la DnaB), ya que una Met (un aa recomendado en la posición DnaB +1, según el sistema IMPACT-TWIN) agregada en la posición +1, permitió el clivaje de la proteína de fusión.

Las proteínas que contienen puentes disulfuro, como la hGH, se pueden expresar en el espacio periplásmico de *E. coli*, ya que el ambiente oxidante y un sistema propio de formación de puentes disulfuro (Dsb), facilita la formación de los mismos en forma adecuada. La expresión de la hGH en el espacio periplásmico de *E. coli* también se ha reportado (Ghasemi et al., 2004; Jeiranikhameneh et al., 2017; Soares et al., 2003). Esta estrategia supera el problema de la fMet N-terminal descrito anteriormente. Perez-Perez et al. (2020) usaron una etiqueta de afinidad para la expresión y purificación de proteínas recombinantes periplásmicas en *E. coli*, pero esta estrategia involucra la posterior incubación con proteasas y algunos pasos extras de purificación para la proteína de interés. En nuestro nuevo sistema de expresión periplásmica, la proteína de interés se fusiona mediante su extremo N-terminal, a un péptido señal de secreción DsbA, a la vez que se

fusiona en su extremo C-terminal, a una etiqueta autoclivable DnaX unida a un CBD (tag de afinidad). Este sistema permite expresar y purificar la proteína de interés, mediante un proceso de purificación por cromatografía de afinidad en un solo paso.

Wu et al. (2011) utilizaron la etiqueta autoclivable CBD- Δ I-CM para la expresión y purificación de proteínas recombinantes periplásmicas en *E. coli*. Sin embargo, con este método se obtuvo a una baja recuperación de las proteínas purificadas (~14%), en mayor parte por un clivaje prematuro de la inteína durante la expresión de la misma, y/o un clivaje incompleto de la etiqueta Δ I-CM (la eficiencia de corte fue entre un 60% a un 90%). Cuando usamos nuestro nuevo sistema de expresión periplásmico basado en la mini inteína *Ssp* DnaX, la proteína periplásmica recombinante fue expresada eficientemente, pero una considerable proporción de la proteína de fusión sufrió clivaje *in vivo*. Como la actividad de clivaje de la inteína DnaX se induce mediante un cambio de pH, decidimos utilizar un medio de cultivo bufferizado. De esta manera, observamos que a medida que el pH del medio de cultivo aumenta, se produce un notable incremento en la cantidad total de proteína periplásmica recombinante y una reducción en la cantidad total de proteína recombinante escindida *in vivo*. El máximo nivel de expresión de la rhGH-DnaX-CBD periplásmica, se observó en LB bufferizado con Tris-HCl a pH 8. El uso de este sistema de expresión en biorreactor, con medio LB bufferizado con Tris-HCl a pH 8 (2-L de cultivo en *batch*), proporcionó resultados considerablemente mejores. Luego de 16-18 h de expresión de la proteína recombinante de fusión, a 20 °C, una gran cantidad de la misma se acumuló en el espacio periplásmico, de la cual sólo un 6-12% sufrió clivaje *in vivo* y más del 90% experimentó clivaje *in vitro*, en el paso de purificación. El análisis por espectrometría de masas (MS) de la rhGH periplásmica purificada, reveló la masa esperada de la rhGH correctamente plegada (191 aa y dos puentes disulfuro). El análisis por MALDI-TOF MS de la rhGH purificada con posterior digestión triptica, reveló que el péptido señal N-terminal DsbA y la etiqueta de afinidad C-terminal DnaX-CBD fueron correctamente removidos, ya que el primer aa de la rhGH purificada era Phe y los dos puentes disulfuro estaban correctamente formados. De esta manera, la etiqueta de afinidad autoclivable basada en la inteína DnaX hizo posible la expresión y purificación en un solo paso de la proteína de interés (rhGH), con la particularidad que la secuencia de aminoácidos comienza con un residuo diferente de Met (Phe), contiene los puentes disulfuro correctamente formados y no posee aminoácidos N- o C-terminales adicionales.

En conclusión, diseñamos e implementamos un nuevo sistema de expresión y purificación de proteínas recombinantes periplásmicas, en *E. coli*, mediante una etiqueta de afinidad autoclivable, basada en la inteína DnaX, y en un medio de cultivo bufferizado. Este sistema está destinado, principalmente, a proteínas que contienen puentes disulfuro. Combina el envío de las proteínas recombinantes al espacio periplásmico con un péptido señal en el N-terminal, y en el C-terminal, una etiqueta de afinidad autoclivable inducible por cambio de pH y temperatura, basada en la inteína DnaX. La etiqueta de afinidad autoclivable facilita la expresión eficiente de proteínas recombinantes periplásmicas

mediante el uso de un medio de cultivo bufferizado, y a la vez proporciona, asociada a un tag de afinidad, un método de purificación de un solo paso. Este es un proceso simple, rápido y económico para la producción de proteínas de uso terapéutico, industrial y/o académico.

I.4. MATERIALES Y MÉTODOS

I.4.1. Técnicas de biología molecular

Los plásmidos se purificaron utilizando el kit de purificación Wizard Plus SV Miniprep DNA purification system (Promega Corp.; Madison, WI, EE. UU.), High-Speed Plasmid Mini Kit (Geneaid Biotech; New Taipei City, Taiwán) o el Presto Mini Plasmid Kit (Geneaid). Las extracciones de ADN desde geles de agarosa se realizaron utilizando el AccuPrep Gel Kit (Bioneer; Daejeon, Corea del Sur). Las enzimas de restricción fueron de Promega Corp. (Madison, WI, EUA) y Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). La T4 ADN ligasa fue de Thermo Fisher. Los clonados, electroforesis en gel de agarosa, transformación química de células de *E. coli*, SDS-PAGE y ensayos de *Western blot* se realizaron por métodos estándar (Sambrook et al., 1989).

I.4.2. Construcción de los plásmidos

Los plásmidos de expresión utilizados en este trabajo, fueron construidos de la siguiente manera:

pTYB12-rhGH: vector pTYB12 (New England Biolabs [NEB]; Ipswich, MA, EE. UU.) con un segmento de ADN sintético (GenScript, <https://www.genscript.com/>), que contiene la secuencia codificante de la hGH (NP_000506.2, aminoácidos 27–217), ubicada entre el sitio de corte (↓) de la inteína *Sce* VMA y el sitio de restricción *Xho*I (CTCGAG) [GTA(V)CAG(Q)AAT(N)↓TTT(Phe)...(hGH ORF)...TAACTCGAG]. En este plásmido, la hGH comienza con su aminoácido natural, Phe.

pTWIN1-rhGH: vector pTWIN1 (NEB) con un segmento de ADN sintético (GenScript) que contiene la secuencia codificante de la hGH (como se describió anteriormente), ubicada entre el sitio de corte (↓) de la mini inteína *Ssp* DnaB y el sitio de restricción *Bam*HI (GGATCC) (eliminando la secuencia codificante de la inteína *Mxe* GyrA del plásmido pTWIN1) [ATT(I)GTA(V)CAC(H)AAC(N)↓TTT (Phe)...(hGH ORF)...TAAGGATCC]. En este plásmido, la hGH comienza con su aminoácido natural, Phe.

pTWIN1-M-rhGH: vector pTWIN1-rhGH (ver arriba) con un codón (**ATG**) que codifica para una Met, insertado entre el sitio de corte de la mini inteína *Ssp* DnaB (↓) y el codón Phe, de la hGH [ATT(I)GTA(V)CAC(H)AAC(N)↓**ATG(M)**TTT(Phe)...(hGH ORF)...TAAGGATCC]. En este plásmido, la hGH comienza con el aminoácido Met.

pET25b-DnaX-rhGH: vector pET25b (Novagen; Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) con un segmento de ADN sintético que contiene las secuencias codificantes de una etiqueta His-tag, un CBD, la mini inteína *Ssp* DnaX y la secuencia codificante de la hGH (como se describe anteriormente) (GenScript). Este constructo se localiza entre los sitios de restricción *Nde*I y *Sac*I.

pET25b-DsbA-rhGH-DnaB y pET25b-DsbA-rhGH-DnaX: vector pET25b (Novagen; Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) con un segmento de ADN sintético que codifica el péptido señal periplásmico DsbA (Samant et al., 2014) y la secuencia codificantes de la hGH (como se describe anteriormente) (GenScript), seguida por las secuencias codificantes de las mini inteínas, *Ssp DnaB* o *Ssp DnaX* (respectivamente), un CBD y la secuencia codificante de una etiqueta His-tag (Gene Universal, <https://www.geneuniversal.com>); este constructo se localiza entre los sitios de restricción NdeI y HindIII.

El uso de codones de todos los segmentos sintéticos, excepto para la señal periplásmica DsbA, fue optimizado para la expresión en *E. coli*. Los plásmidos fueron transformados en las correspondientes cepas de expresión de *E. coli*. Los constructos plasmídicos y las cepas de expresión de *E. coli* utilizadas se enumeran en la Tabla I-1.

Tabla I-1

Constructos plasmídicos y cepas de expresión utilizados para la expresión de la rhGH.

Plásmido	Cepa de expresión	Proteína recombinante de fusión*	Proteína dirigida a:	Inteína	Condición de autoclivaje	Fusión**
pTYB12-rhGH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen) y Origami (Novagen)	CBD-VMA1-rhGH	Citoplasma	Inteína <i>Sce</i> VMA1	Clivaje inducible por tioles ¹	N-terminal
pTWIN1-rhGH	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen)	CBD-DnaB-rhGH	Citoplasma	Mini inteína <i>Ssp DnaB</i>	Cambio de pH y temperatura ²	N-terminal
pTWIN1-M-rhGH	SHuffle (NEB)	CBD-DnaB-M-rhGH	Citoplasma	Mini inteína <i>Ssp DnaB</i>	Cambio de pH y temperatura ²	N-terminal
pET25b-DnaX-rhGH	Origami (Novagen)	His-tag-CBD-DnaX-rhGH	Citoplasma	Mini inteína <i>Ssp DnaX</i>	Cambio de pH y temperatura ²	N-terminal
pET25b-DsbA-rhGH-DnaB	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen)	DsbA-rhGH-DnaB-CBD-His-tag	Periplasma	Mini inteína <i>Ssp DnaB</i>	Cambio de pH y temperatura ²	C-terminal
pET25b-DsbA-rhGH-DnaX	<i>E. coli</i> BL21 (DE3) (Novagen)	DsbA-rhGH-DnaX-CBD-His-tag	Periplasma	Mini inteína <i>Ssp DnaX</i>	Cambio de pH y temperatura ²	C-terminal

* CBD (Dominio de unión a quitina), VMA 1 (inteína *Sce* VMA1), rhGH (hormona de crecimiento humana recombinante que inicia con el aminoácido Phe), DnaB (mini inteína *Ssp DnaB*), DnaX (mini inteína *Ssp DnaX*), M-rhGH (hormona de crecimiento humana recombinante, que inicia con el aminoácido Met), His-tag (etiqueta de 6 histidinas), DsbA (péptido señal periplásmico, DsbA)

** Extremo de la proteína rhGH fusionado con la inteína.

¹ Buffer de clivaje: Tris-HCl 20 mM, pH 8.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM, DTT 100 mM [IMPACT-CN system manual NEB]).

² Buffer de clivaje: Tris-HCl 20 mM, pH 6.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM [IMPACT-TWIN system manual (NEB)].

I.4.3. Expresión y purificación de proteína

Las células de *E. coli* transformadas se cultivaron a 37 °C con agitación, en 500 mL de medio LB con ampicilina (100 µg/mL), hasta un valor de OD₆₀₀ 0,6-0,8. La expresión de proteínas recombinantes se indujo mediante la adición de lactosa 0,17 %, seguido de una incubación durante toda la noche a 20 °C, con agitación.

Luego se colectaron las células, se resuspendieron en buffer de unión (Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) y se lisaron por homogeneización a alta presión (Avestin Emulsiflex C3). Los sobrenadantes de los lisados centrifugados se incubaron con 1 mL (volumen de cama) de Chitin Resin (NEB) a 4 °C, con agitación. Las proteínas no unidas, se eliminaron lavando con 30 volúmenes de cama de buffer de unión. Para el clivaje en columna, la columna se lavó rápidamente con 3 volúmenes de cama del buffer de clivaje. Luego, se detuvo el flujo de la columna y se añadieron dos volúmenes de cama del buffer de clivaje y la columna se dejó a temperatura ambiente durante toda la noche. Los buffers de clivaje utilizados para cada proteína quimérica están enumerados en la Tabla I-1. Las proteínas purificadas se cuantificaron usando el método de Bradford (Bradford Protein Assay Bio-Rad; Hercules, CA, EE. UU.) y fueron analizadas por SDS-PAGE (15%).

I.4.4. Análisis HPLC

La rhGH fue analizada mediante HPLC, luego de ser digerida con tripsina. Las digestiones tríplicas fueron llevadas a cabo como se describe en la Farmacopea Europea (Edición 7.0, 2011), con las siguientes modificaciones. Nuestra rhGH citoplasmática purificada y una rhGH comercial (Biosidus; Argentina), fueron desaladas y el buffer intercambiado por Tris-HCl 50 mM, pH 8. Las muestras conteniendo ~300 µg de proteína, fueron incubadas con 2 µg de tripsina de páncreas bovino (cat # T8658, Sigma-Aldrich) en 200 µL de Tris-HCl 50 mM, pH 8, durante 18 h a 37 °C. Luego, las muestras se incubaron en hielo, para detener la reacción de digestión, y se mantuvieron a 4 °C hasta el análisis por HPLC. Las muestras digeridas (~30 µg) se cargaron en una columna Zorbax 300SB-C8 (Agilent Tecnologías; Santa Clara, CA, EE. UU.) con una fase móvil A (ácido trifluoroacético 0,1 %) y se eluyeron con un gradiente de 0 a 80 % de fase móvil B (ácido trifluoroacético 0,1 % en acetonitrilo 90 %), durante 70 min, a un flujo 1 mL / min, a 30 °C. La elución de los péptidos tríplicos fue monitoreada mediante absorbancia a 214 nm.

I.4.5. Autoclivaje libre de resina

Las células que fueron inducidas para la expresión de la proteína recombinante, se lisaron en buffer de clivaje (Tabla I-1). El lisado celular se centrifugó (10.000 rpm, 30 min) y el sobrenadante se incubó toda la noche, a temperatura ambiente con agitación suave. El buffer fosfato de clivaje (buffer fosfato 50 mM, pH 6,5, EDTA 5 mM (Lu et al., 2011), también fue utilizado para las proteínas de fusión CBD-DnaB-rhGH y CBD-DnaB-M-rhGH. Las muestras sin incubar y después de incubar, fueron analizadas por SDS-PAGE (15 %).

I.4.6. Efecto del pH del medio de cultivo en el clivaje *in vivo* de la inteína en periplasma

Las cepas de *E. coli* conteniendo el vector de expresión pET25b-DsbA-rhGH-DnaX, se cultivaron en 50 mL de medio LB bufferizado, con buffer Tris-HCl 89 mM o buffer fosfato de potasio 89 mM, a diferentes valores de pH (6,5; 7; 7,5; 8). Las células en cada condición de pH, se cultivaron en presencia de ampicilina 100 µg/mL y a 37 °C con agitación, hasta un valor de OD₆₀₀ 0,6-0,8. La expresión de proteínas recombinantes se indujo por la adición de lactosa al 0,17 % a 20 °C y se mantuvo durante 18 h con agitación. Los sedimentos celulares provenientes de 1mL de cultivo se resuspendieron en 420 µL de buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, EDTA 1 mM) y se lisaron por sonicación. Las muestras de extracto total de proteína, se analizaron mediante SDS-PAGE (15 %) seguido de un ensayo *Western blot* utilizando un anticuerpo anti-His-tag (n.º de cat.H1029; Sigma-Aldrich). Como anticuerpo secundario, se usó un anticuerpo de ratón anti-IgG de cabra acoplado a IRDye 800CW (cat # 926-32210; LI-COR Biosciences; Lincoln, NE, EE. UU.). Los anticuerpos se detectaron usando el sistema de imágenes infrarrojas Odyssey (LI-COR), y las intensidades de bandas de cinco ensayos *Western blot* se cuantificaron utilizando el Image Lab Software (Bio-Rad).

I.4.7. Producción de la rhGH en biorreactor

Una colonia fresca de *E. coli* conteniendo el vector de expresión pET25b-DsbA-rhGH-DnaX, se usó para inocular un cultivo de 50 mL de medio LB con 100 µg/mL de ampicilina, que se incubó durante toda la noche a 37 °C con agitación. Luego, 20 mL de este medio se diluyeron 1:50 en 1 L de medio LB bufferizado (Tris-HCl 89 mM, pH 8), conteniendo 100 µg/mL de ampicilina y se cultivó a 37 °C con agitación, hasta un valor de OD₆₀₀ 0,6 – 0,8. Posteriormente, se indujo la expresión de proteínas durante 18 hs a 20 °C, mediante el agregado de lactosa hasta una concentración final de 0,17%. El cultivo fue realizado en *batch* utilizando el sistema BIOSTAT A (Sartorius AG; Gotinga, Alemania) con una velocidad de agitación de 700 rpm y un flujo de aire de 0,6 L min⁻¹.

Se tomaron muestras de cultivo de 1 mL cada 2 hs. Las muestras fueron centrifugadas, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 420 µL de buffer (Tris-HCl 20 mM, pH 8,5, EDTA 1 mM) y se lisaron por sonicación. Las muestras de extracto total de proteína, se analizaron mediante SDS-PAGE (15 %), seguidas de ensayo *Western blot* usando un anticuerpo anti-His-tag, como se describió previamente. Las intensidades de banda de siete ensayos *Western blot*, se cuantificaron utilizando el Image Lab Software.

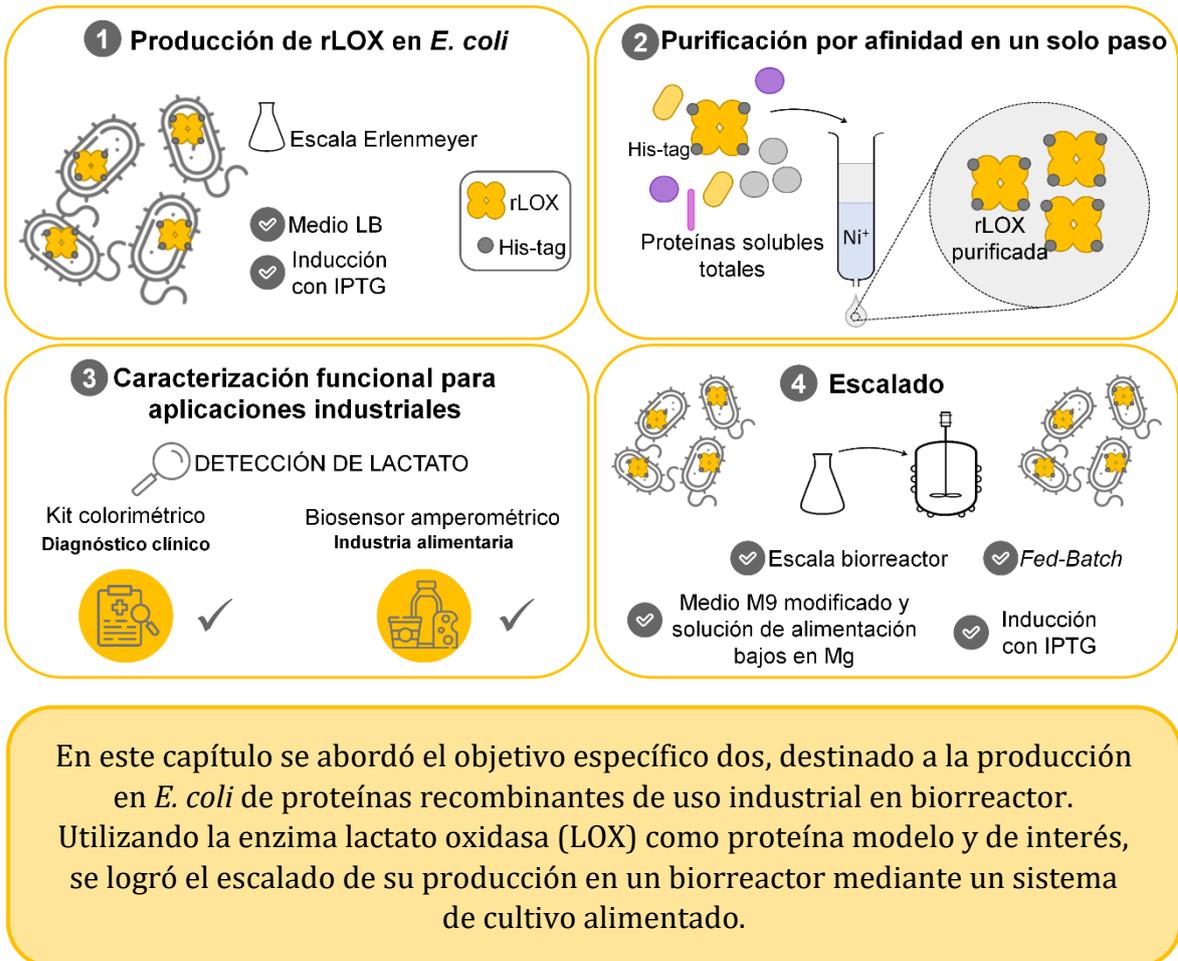
Las células totales se recolectaron 18 h después de la inducción para la purificación de la proteína. La rhGH se purificó como se describió anteriormente (“Expresión y purificación de proteína”), excepto que el clivaje se indujo con 1 volumen de cama de buffer de clivaje. Las proteínas purificadas se cuantificaron usando el método de Bradford (Bradford Protein Assay Bio-Rad; Hercules, CA, EE. UU.) y se analizaron mediante SDS-PAGE (15%).

I.4.8. Análisis mediante espectrometría de masas

Las muestras de la rhGH periplásmica purificada y una rhGH comercial (Biosidus; Argentina), se sembraron en un gel de poliacrilamida (22 µg/carril) y se analizaron mediante SDS-PAGE (15 %). Después de la corrida electroforética, el gel fue sumergido en solución fijadora [etanol 30 % (v/v), ácido fosfórico 2 % (v/v)], y luego se incubaron en solución de tinción [metanol 18 % (v/v), (NH₄)₂SO₄ 17% (p/v), ácido fosfórico 2 % (v/v), azul de Coomassie G-250 0,5 g/l], hasta que las bandas de proteína fueron visibles. Se cortaron las bandas de proteínas (rhGHs) del gel y se transfirieron a tubos Eppendorf (1,5 mL). Estas muestras fueron enviadas al CEQUIBIEM (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires), donde se alquilaron (o redujeron y alquilaron) y se digirieron con tripsina. Posteriormente, los péptidos resultantes fueron analizados por MALDI-TOF MS. La rhGH purificada se envió al ICYTAC-CONICET-UNC, Universidad Nacional de Córdoba, para el análisis de la proteína completa por ESI-Q-TOFF MS.

CAPÍTULO II

PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA LACTATO OXIDASA PARA APLICACIONES INDUSTRIALES MEDIANTE CULTIVO *FED-BATCH*



II.1. INTRODUCCIÓN

El mercado global de enzimas está impulsado, principalmente, por la creciente demanda de enzimas industriales del sector farmacéutico, de alimentos y bebidas y de alimentación animal. Sin embargo, el uso de enzimas aún está limitado debido a los bajos rendimientos, la baja reproducibilidad y el rendimiento no siempre óptimo de estos biocatalizadores en su forma nativa. La tecnología del ADN recombinante y los avances en la ingeniería de proteínas, han sido utilizados para generar una alta producción de enzimas, así como nuevas enzimas rediseñadas con propiedades mejoradas, que cumplen con requisitos industriales específicos. Las enzimas tienen propiedades biocatalíticas notables, por lo que se utilizan ampliamente para la detección rápida de varios metabolitos. El análisis de estos metabolitos juega un papel importante en el diagnóstico de diversas enfermedades y/o en la producción y control de calidad de alimentos y bebidas (Trono, 2019).

La L-lactato oxidasa (LOX) (EC 1.1.3.2) pertenece a la familia de flavoproteínas que catalizan la oxidación de α -hidroxiácidos. Esta enzima oxida el L-lactato a piruvato, en presencia de oxígeno disuelto, generando peróxido de hidrógeno (Duncan et al., 1989; Leiros et al., 2006; Umena et al., 2006). La LOX es ampliamente utilizada en la industria farmacéutica, y de alimentos y bebidas. En medicina, la enzima se usa para medir la concentración de lactato en la sangre y otros fluidos corporales. La asociación entre niveles elevados de lactato y diversas enfermedades (como shocks, trastornos metabólicos, insuficiencia respiratoria e insuficiencia cardíaca) implica que la detección de su concentración en sangre es fundamental como parámetro diagnóstico. También, es útil en medicina deportiva, particularmente para estimar las condiciones físicas de los atletas. En la industria de alimentos y bebidas, la cantidad de lactato es un indicador de la presencia de fermentación bacteriana, y está relacionada con la frescura y la calidad de varios productos (Parra et al., 2006; Przybyt, 2014; Rathee et al., 2016).

La LOX se puede obtener desde varias fuentes bacterianas y es utilizada como catalizador en la fabricación de biosensores y kits colorimétricos para detectar lactato (Meléndez et al., 2021; Rathee et al., 2016). La LOX aislada de *Aerococcus viridans* ha sido ampliamente caracterizada, y sus propiedades enzimáticas se han analizado y estudiado extensivamente en aplicaciones de biodetección (Fitriana et al., 2020; Furubayashi et al., 2021; Leiros et al., 2006; Rathee et al., 2016; Stoisser et al., 2016; Xuan et al., 2021; Yorita et al., 2000; Zaydan et al., 2004). Esta enzima de *A. viridans* es un homotetrámero (monómero de 41 kDa) y utiliza un flavin mononucleótido (FMN) como cofactor (Umena et al., 2006).

Si bien la LOX de *A. viridans* se encuentra disponible comercialmente en su forma nativa o recombinante, la misma no se comercializa con etiquetas de afinidad. Esto implica que la proteína recombinante requiere de varios pasos de purificación (altos costos de producción) o simplemente se vende parcialmente purificada (baja actividad específica y pureza limitada). Además, pocos artículos científicos publicados se centran en el estudio de

la producción recombinante de esta proteína para aplicaciones industriales (Hiraka et al., 2018, 2020; Li et al., 2020; Taurino et al., 2013). En el trabajo de Taurino et al. (2013) se estudiaron tres lactato oxidasas recombinantes de *A. viridans*, una con His-tag N-terminal, otra con His-tag C-terminal y una LOX *wild-type*. Las tres variantes de la enzima LOX fueron expresadas en *E. coli*, purificadas y analizadas. La enzima que lleva el His-tag C-terminal no mostró actividad enzimática, mientras que la LOX etiquetada con His-tag N-terminal, no solo mostró actividad enzimática, sino que también tuvo un mejor desempeño en cuanto a actividad/detección en un biosensor basado en nanotubos de carbono de pared múltiple.

En nuestro grupo de trabajo, la Dra. Agustina Godino (Becaria Post-Doctoral bajo la dirección del Dr. José L. Barra) y la alumna Agustina Manassero (quien realizó su Practicanato Profesional bajo la dirección de la Dra. Godino), iniciaron el desarrollo del proceso para la producción de la LOX de *A. viridans*. Posteriormente, yo me incorporé al proyecto. En este trabajo desarrollamos y optimizamos un proceso para la producción, a escala de biorreactor, de una LOX recombinante de *A. viridans* con un His-tag N-terminal en *E. coli*, y realizamos su caracterización funcional para la aplicación industrial de esta enzima en un kit colorimétrico y en un biosensor amperométrico.

II.2. RESULTADOS

II.2.1. Expresión y purificación de la proteína rLOX desde cultivo en Erlenmeyer

Para la expresión de la proteína lactato oxidasa recombinante con His-tag de *A. viridans* (rLOX), realizamos una construcción en el plásmido de expresión pET50, como se explica en Materiales y Métodos (sección II.4.1). La proteína rLOX se expresó en la cepa BL21 de *E. coli*, durante toda la noche a 22 °C, usando isopropil b-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor. Bajo estas condiciones experimentales, la rLOX se observó como una banda de proteína mayoritaria de aproximadamente 43 kDa (41 kDa del monómero de rLOX y 2 kDa de la etiqueta His-tag) en el extracto total de proteína, después de la lisis celular (**Figura II-1**). La proteína recombinante se unió a una columna de Ni-NTA y posteriormente, fue eluida con imidazol. Después de un solo paso de purificación por afinidad se recuperó eficientemente una rLOX de alta pureza (**Figura II-1**), obteniendo un rendimiento de aproximadamente 30-35 mg/l desde un cultivo en Erlenmeyer, con una actividad específica de aproximadamente 250 U/mg.

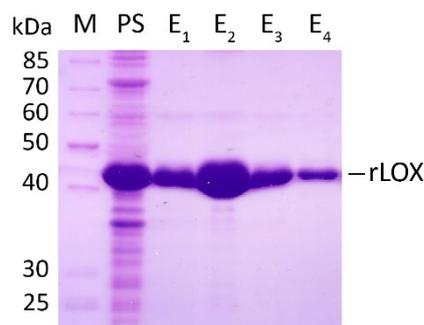
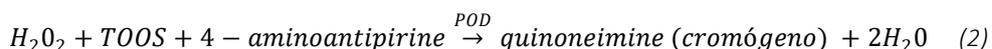
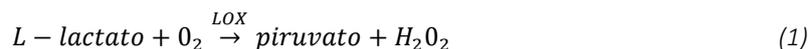


Figura II-1. Análisis mediante SDS-PAGE de la purificación de la proteína rLOX. Carril M: marcador de peso molecular de proteínas (PageRuler Unstained Protein Ladder; Thermo Fisher), carril PS: extracto de proteína soluble después de la lisis celular, carriles E1-E4: fracciones eluidas de la columna de afinidad.

II.2.2. Caracterización funcional de la rLOX en un kit diagnóstico comercial

La actividad de la enzima rLOX purificada en nuestro laboratorio se evaluó en el kit de diagnóstico Lactate (Wiener Laboratorios SAIC, Argentina) que se utiliza para medir concentraciones de lactato en sangre o líquido cefalorraquídeo. Actualmente, el kit comercial está formulado con una lactato oxidasa recombinante comercial de *A. viridans* producida en *E. coli*, que no posee ninguna etiqueta de afinidad. Este kit comercial se basa en dos reacciones, en la primera (Ec. 1) el lactato de la muestra es oxidado específicamente por la enzima LOX y el peróxido de hidrógeno producido se utiliza en una segunda reacción (Ec. 2), catalizada por el enzima peroxidasa (POD), para generar un cromógeno. La intensidad del color del cromógeno formado es directamente proporcional a la concentración de L-lactato en la muestra.

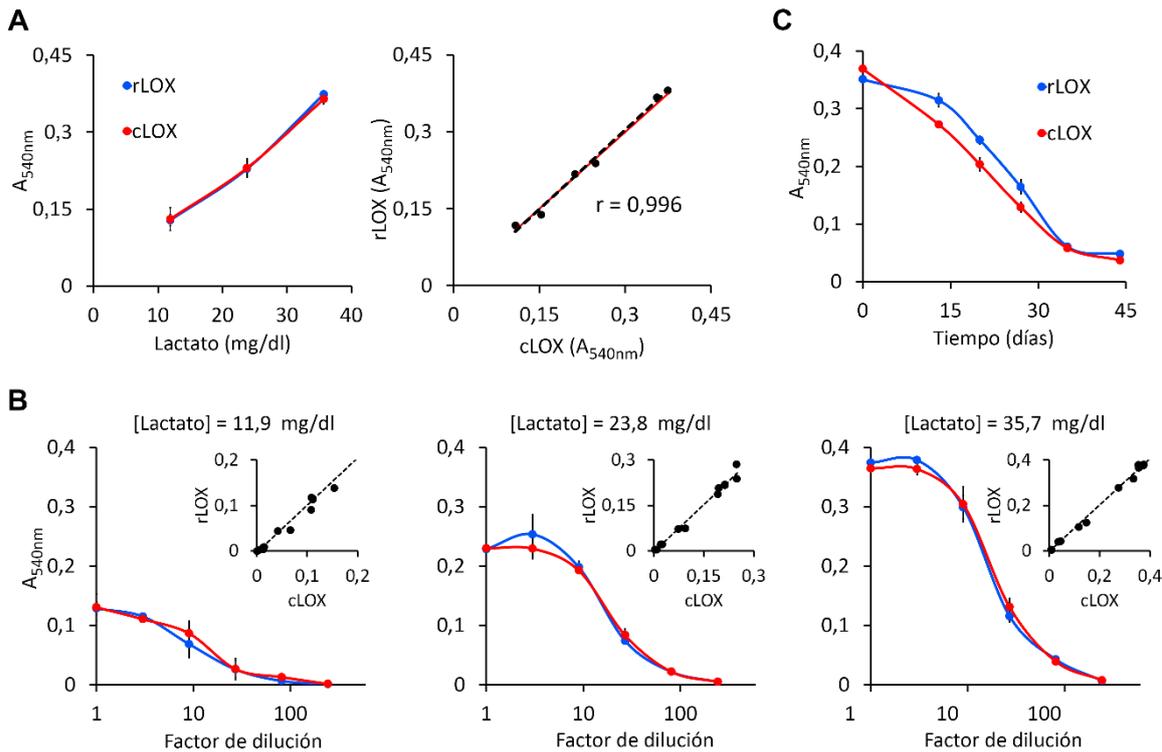


Se formuló un kit Lactate con nuestra rLOX purificada y se lo comparó con el kit comercial, como se describe en Materiales y Métodos (sección II.4.3). Se obtuvieron resultados similares, tanto con el kit formulado con nuestra rLOX purificada, como con el kit comercial. Se observó que a medida que aumenta la concentración de lactato en la muestra, se produce un incremento proporcional en la absorbancia del cromógeno formado en la reacción. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el kit formulado con nuestra rLOX y el kit comercial (**Figura II-2A**, panel izquierdo). Además, un análisis de correlación (**Figura II-2B**, panel derecho) entre los datos de la cuantificación de lactato, realizados con el kit formulado con la rLOX y el kit comercial, mostró una regresión lineal con la siguiente ecuación de regresión: $y = 1,034x - 0,006$ (coeficiente de correlación (r) = 0,996). Los valores de pendiente e intersección de esta línea de tendencia estaban muy cerca de los valores esperados para una correlación ideal (pendiente = 1, intersección = 0), lo que indica una correlación muy alta entre la funcionalidad de ambas LOXs.

Como se explicó en Materiales y Métodos (sección II.4.3), el kit comercial de Lactate consta de dos reactivos: Reactivo A y Reactivo B. El Reactivo B del kit comercial está formulado con exceso de enzimas. Para analizar la funcionalidad de ambas enzimas LOXs en condiciones limitantes, se realizaron diluciones seriadas de las LOXs (en Reactivo B, sin LOX comercial) antes de la reacción enzimática. Se observaron resultados similares con ambas LOXs cuando las reacciones del kit se realizaron a cualquiera de las tres concentraciones iniciales de lactato (11,9, 23,8 o 35,7 mg/dl), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre nuestra rLOX y la LOX comercial (**Figura II-2B**). El análisis de correlación mostró una muy buena concordancia entre el rendimiento de nuestra rLOX y el rendimiento de la LOX comercial, en todas las concentraciones de lactato analizadas (**Figura II-2B**, paneles pequeños).

Finalmente, se analizó la estabilidad de los Reactivos B del kit (el comercial y el formulado con nuestra rLOX) a lo largo del tiempo. Se observó una estabilidad similar después de la incubación de los dos Reactivos B, a 37°C durante 45 días. Ambos Reactivos B, mostraron una pérdida de funcionalidad de aproximadamente un 85% al día 45 (85% el reactivo que contenía la rLOX, 86% el reactivo comercial). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el kit formulado con nuestra proteína y el comercial (**Figura II-2C**).

Estos resultados indican que la rLOX con His-tag producida en nuestro laboratorio es competente para formular un kit de diagnóstico bioquímico, con un rendimiento comparable a una LOX recombinante comercial que no posee ninguna etiqueta de afinidad.



del kit formulado con nuestra rLOX, con respecto al kit comercial. Panel izquierdo: variación de la absorbancia (540 nm) en función de la concentración de lactato. Panel derecho: gráfico de correlación, la línea discontinua negra representa la ecuación de regresión ($y = 1,034x - 0,006$) y la línea roja representa la línea de identidad ($y=x$). B) Funcionalidad de los kits Lactate, tras las diluciones seriadas de la LOX comercial y la rLOX purificada, en Reactivo B sin LOX comercial, a tres concentraciones de lactato (11,9; 23,8 o 35,7 mg/dl). Paneles grandes: variación de la absorbancia (540 nm) en función del factor de dilución (escala logarítmica). Paneles pequeños: gráficos de correlación de rLOX (A_{540} nm) frente a cLOX (A_{540} nm). Las líneas discontinuas negras representan las ecuaciones de regresión [$y = 0,988x - 0,003$; $r=0,986$ (11,9 mg/dl lactato), $y = 1,058x - 0,004$, $r=0,992$ (23,8 mg/dl lactato) e $y = 1,027x - 0,004$, $r=0,997$ (35,7 mg/dl de lactato)]. C) Estabilidad del Reactivo B del kit formulado con la rLOX purificada, en comparación con el Reactivo B del kit comercial, después de su incubación a 37 °C por 45 días en total. rLOX (azul): kit formulado con nuestra rLOX purificada; cLOX (rojo): kit comercial. En todos estos experimentos las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$) por la prueba t de Student, comparando la rLOX y cLOX en cada concentración de lactato (A), dilución (B) o día de incubación (C)].

II.2.3. Caracterización funcional de la rLOX en un biosensor

La proteína rLOX purificada fue enviada a la empresa NovoSens (<https://novosens.com/>) a los fines que su funcionamiento en biosensores fuera analizado. Los estudios en biosensores fueron realizados por el alumno Martín Alonzo Pérez en el marco de la realización su Practicanato Profesional de la Licenciatura en Biotecnología (Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba), bajo la dirección del Dr. Fausto Comba y el Dr. Lucio Simonella (NovoSens, Córdoba, Argentina). A continuación, se muestran algunos de los resultados que obtuvieron que muestran el funcionamiento de la rLOX para su uso en biosensores.

Nuestra rLOX purificada se evaluó en un biosensor desarrollado por NovoSens. Este biosensor es un electrodo enzimático amperométrico preparado con nuestra rLOX purificada, la cual fue inmovilizada sobre la superficie del electrodo, con el propósito de medir la concentración de ácido láctico en matrices alimentarias, como los productos lácteos.

Cuando el biosensor se introduce en una muestra que contiene lactato, la lactato oxidasa cataliza la conversión de L-lactato a piruvato en presencia de oxígeno disuelto, produciendo peróxido de hidrógeno, que se oxida catalíticamente. La corriente electrocatalítica medida es directamente proporcional a la concentración de peróxido, que está directamente relacionada con la cantidad de lactato presente en la muestra.

Los biosensores conteniendo la rLOX purificada fueron evaluados y comparados con los biosensores funcionalizados con una LOX comercial (Sigma-Aldrich), la cual es una enzima nativa (no recombinante) obtenida de *A. viridans*. Ambos biosensores fueron funcionales y mostraron un desempeño analítico similar. Al evaluar los parámetros analíticos se observaron pequeñas diferencias entre los biosensores. Los biosensores conteniendo la LOX comercial (sLOX) mostraron una sensibilidad ligeramente mayor, pero fueron un poco más lentos que los biosensores funcionalizados con nuestra rLOX (**Figura II-3A**, sensibilidad y tiempo de respuesta). El límite superior de linealidad fue similar en ambos biosensores (**Figura II-3A**). Las sutiles diferencias observadas entre las enzimas no fueron estadísticamente significativas. Además, se analizó la estabilidad de los biosensores a lo largo del tiempo en un rango de pH 6-8, donde ambos biosensores mostraron un funcionamiento similar (**Figura II-3A**).

Posteriormente, se evaluó el límite de detección de los biosensores (ver Materiales y Métodos, sección II.4.4). El biosensor funcionalizado con nuestra rLOX detectó una concentración de 2,0 μM de ácido láctico, mientras que el biosensor con la LOX comercial detectó 5,0 μM de ácido láctico (**Figura II-3B**).

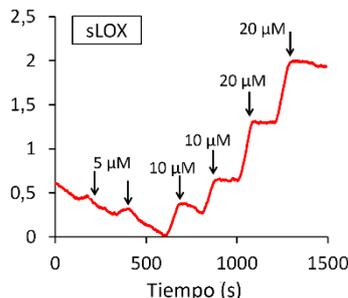
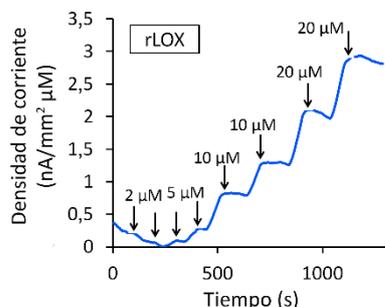
Finalmente, los biosensores construidos con nuestra rLOX se utilizaron para cuantificar la concentración de ácido láctico en un yogur comercial. El amperograma de la **Figura II-3C** muestra los aumentos de corriente producidos por el agregado de ácido láctico registrados con los biosensores funcionalizados con nuestra rLOX (rojo). Se observaron tres incrementos de corriente, el primero y el tercero corresponden a la adición de soluciones estándar de ácido láctico (100 μM), mientras que el segundo corresponde al ácido láctico detectado cuando se añadió la muestra de yogur. El amperograma también muestra que el transductor electroquímico no funcionalizado (control negativo; línea negra) no registró señal. La concentración de ácido láctico determinada en el yogur por el biosensor que contenía la rLOX (90 ± 2 mM) estuvo dentro del rango de concentración permitido en el Código Alimentario Argentino (70-200 mM) (https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/capitulo_viii_lacteos_actualiz_2020-01.pdf).

Estos resultados indican que nuestra rLOX con His-tag tiene un rendimiento equivalente a una LOX comercial no recombinante, cuando se aplica en biosensores diseñados para medir la concentración de ácido láctico.

A

Parámetro	Estabilidad					
			Tiempo		pH	
	rLOX	sLOX	rLOX	sLOX	rLOX	sLOX
Sensibilidad [nA/mm² μM]	0,074 ± 0,009 (a)	0,131 ± 0,027 (a)	Estable por 4 semanas	Estable por 3 semanas	Estable a pH 6-8	Estable a pH 6-8
Tiempo de respuesta (100 μM) [s]	21 ± 5 (a)	27,5 ± 0,5 (a)	Estable por 12 semanas	Estable por 12 semanas	Estable a pH 6-8	Estable a pH 6-8
Tiempo de respuesta (1000 μM) [s]	48 ± 7 (a)	67 ± 1 (a)	Ligero aumento con el tiempo	Ligero aumento con el tiempo	Estable a pH 6-8	Estable a pH 6-8
Límite superior de linealidad [mM]	4,5 ± 0,5 (a)	4,0 ± 0,5 (a)	Estable por 12 semanas	Estable por 12 semanas	Estable a pH 6-8	Estable a pH 6-8

B



C

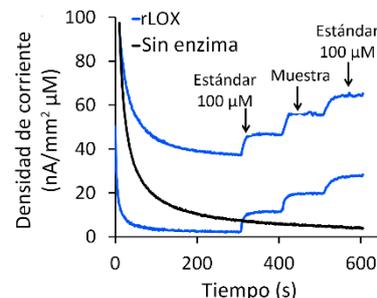


Figura II-3. Análisis funcional de la rLOX en el biosensor NovoSens. A) Parámetros analíticos de los biosensores funcionalizados con la rLOX, en comparación con los biosensores que contienen una LOX comercial (sLOX). Los resultados son medias ± SE de dos biosensores construidos independientemente. Las medias seguidas de las mismas letras entre paréntesis hacen referencia a que no son estadísticamente diferentes ($P \leq 0.05$ por la prueba t de Student). Para la sensibilidad, la estabilidad indica que el biosensor mantiene más del 90% del valor del parámetro determinado. B) Análisis del límite de detección. Registros amperométricos obtenidos de inyecciones sucesivas de ácido láctico (μM). C) Cuantificación de ácido láctico en un yogur comercial (Tregar, Argentina). Registros amperométricos de dos biosensores funcionalizados con nuestra rLOX (rojo) y un biosensor no funcionalizado (negro). rLOX: biosensor funcionalizado con nuestra rLOX purificada, sLOX: biosensor funcionalizado con una LOX comercial (Sigma-Aldrich).

II.3.1. Producción de rLOX en biorreactor mediante cultivo *fed-batch*

Teniendo en cuenta que el uso industrial de la enzima LOX requiere una producción a gran escala, inicialmente se generó un cultivo *fed-batch* (cultivo alimentado) utilizando el medio modificado M9 (Babaeipour et al., 2013). Este medio de cultivo contiene $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l y utiliza una solución de alimentación, conteniendo $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g/l, como se describe en Materiales y Métodos (sección II.4.5.1). Sin embargo, bajo estas condiciones experimentales, se observó un considerable precipitado salino cuando se colectaban las células. Esta precipitación afectó el procesamiento posterior de la proteína. Por lo tanto,

analizamos si una reducción en la concentración de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ tanto en el medio de cultivo como en la solución de alimentación, podría eliminar esta precipitación salina sin afectar el crecimiento celular. De acuerdo con esto, disminuimos la concentración de magnesio a 0,2 g/l y 1 g/l para el medio de cultivo y la solución de alimentación, respectivamente. Utilizando este medio bajo en magnesio no se observó formación del precipitado.

En la **Figura II-4A** se muestra un esquema representativo del crecimiento celular y la concentración de glucosa residual durante el cultivo *fed-batch*, utilizando un medio de cultivo bajo en magnesio. Inicialmente se realizó un cultivo *batch* hasta que la glucosa inicial se consumió completamente (aproximadamente a las 20 horas), indicando el final de esta etapa y el comienzo de la fase de cultivo *fed-batch*. En la etapa de alimentación, la concentración de glucosa se mantuvo por debajo de 1 g/l. Cuando el cultivo creció hasta una DO_{600} de 23, se indujo la expresión de la rLOX por aproximadamente 16 horas a 19 °C utilizando IPTG como inductor. Bajo esta condición experimental, la densidad celular aumentó hasta una DO_{600} de 74 y la biomasa final obtenida (peso celular seco) fue de 24 ± 2 gr/l (**Figura II-4A**).

Al final del cultivo *fed-batch* la rLOX se purificó por una cromatografía de afinidad de un solo paso, mediante la etiqueta His-tag (**Figura II-4B**), obteniéndose un rendimiento de 302 ± 15 mg/l. Finalmente, observamos que la rLOX purificada desde el cultivo en el biorreactor era funcional y mostraba (al igual que la rLOX purificada a partir de un cultivo en Erlenmeyer) un desempeño comparable a la LOX comercial, sin etiqueta de afinidad, en el kit de diagnóstico Lactate (**Figura II-4C**).

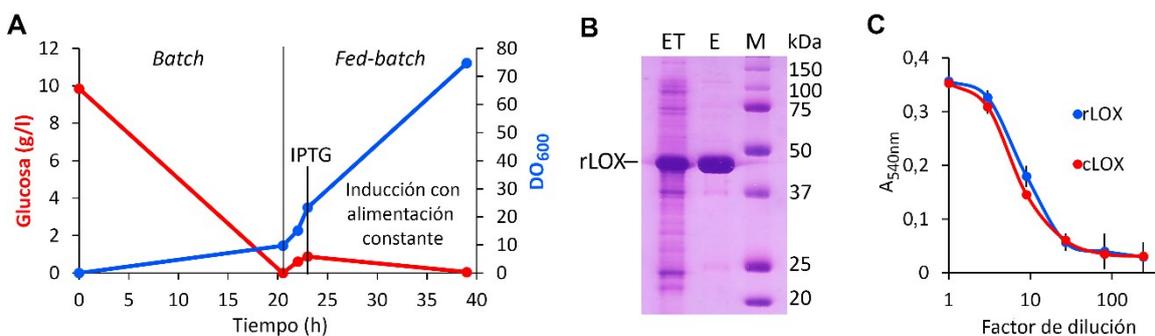


Figura II-4. Producción de rLOX en biorreactor mediante cultivo *fed-batch*. A) Densidad celular y concentración de glucosa residual durante las etapas *batch* y *fed-batch* del cultivo en biorreactor. Se utilizó el medio M9 bajo en magnesio y alimentación con glucosa, como fuente de carbono. La inducción de la proteína recombinante se llevó a cabo durante aproximadamente 16 hs, mediante la reducción de la temperatura a 19 °C y la adición de IPTG 1 mM. B) Análisis SDS-PAGE de la purificación de la proteína rLOX. Carril ET: extracto total de proteína después de la lisis celular, Carril E: eluido después de la cromatografía de afinidad en un solo paso mediante la etiqueta His-tag, Carril M: marcador de peso molecular de proteína (Precision Plus Protein Dual Color Standards; Bio-Rad). C) Funcionalidad de los kits Lactate (kit formulado con la rLOX producida por cultivo *fed-batch* comparado con el kit comercial) después de diluciones seriadas de las LOXs, en Reactivo B sin enzima LOX comercial, a una concentración de lactato de 35,7 mg/dl.

II.3. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta nuestro segundo objetivo, desarrollamos e implementamos el proceso biotecnológico para producir la enzima LOX de *A. viridans* recombinante fusionada a un His-tag, mediante cultivo tipo *fed-batch*, a escala de laboratorio.

La LOX recombinante con His-tag producida y purificada en nuestro laboratorio fue evaluada en el contexto de dos aplicaciones industriales posibles: 1- Kit colorimétrico, para diagnóstico humano, en comparación con una LOX comercial recombinante sin etiqueta de afinidad. 2- Electrodo enzimático amperométrico, para medir el ácido láctico en productos alimenticios, en comparación con una LOX comercial no recombinante. Nuestra rLOX fue completamente funcional y mostró un rendimiento comparable al de las enzimas comerciales, las cuales no poseen etiqueta de afinidad, tanto en el kit de diagnóstico como en el biosensor.

Hasta donde sabemos, no existe una LOX comercial de *A. viridans* fusionada a una etiqueta de afinidad. En general, las etiquetas de afinidad facilitan la purificación de las proteínas recombinantes, pero a veces, después del plegamiento de la proteína, la etiqueta puede quedar oculta y dejar de funcionar. Además, una etiqueta de afinidad también puede afectar el plegamiento, la estabilidad y/o la actividad enzimática de la proteína recombinante, lo que a veces da como resultado enzimas inactivas. En este sentido, el trabajo de Taurino et al. (2013) reportó que la enzima LOX de *A. viridans* fusionada a un His-tag en el C-terminal no mostró actividad, mientras que el derivado N-terminal fue activo y exhibió un mejor rendimiento en un biosensor, en comparación con la proteína sin etiquetar en condiciones experimentales de laboratorio. En el trabajo de Li et al. (Li et al., 2020) también se reportó que una enzima LOX de *A. viridans* fusionada a un His-tag puede usarse para la fabricación enzimática de piruvato (muy demandado debido a sus amplias aplicaciones en las industrias cosmética, farmacéutica y agroquímica). La enzima etiquetada con un His-tag fue funcional para la producción enzimática *in vitro* e *in vivo* de piruvato en condiciones experimentales de laboratorio (Li et al., 2020).

En el presente trabajo de Tesis, demostramos que la enzima rLOX de *A. viridans* fusionada a un His-tag es funcional para aplicaciones en contextos industriales; siendo funcional y estable, como la enzima LOX no etiquetada que actualmente se utiliza en la formulación de un kit de diagnóstico comercial (kit Lactate – Wiener), y en un biosensor.

En los trabajos previos de Taurino et al. (2013) y Li et al. (2020), los autores realizaron la expresión y purificación de una LOX marcada con un His-tag en Erlenmeyer; y reportaron una actividad de 9 U/mL (0,4 mg/mL) y una actividad específica de 220,5 U/mg, respectivamente. Las actividades o actividades específicas de algunas LOX comerciales de *A. viridans* están disponibles, siendo algunas de ellas: ≥ 20 U/mg de sólido (<https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/I9795>), 250 U/mg proteína (<https://www.mybiosource.com/enzyme/lactate-oxidase-aerococcus-viridans/653757>), ≥ 55 U/mg proteína (<https://custombiotech.roche.com/global/en/products/cb/lactate-2->

monooxygenase-lactate-oxidase-grade-i-3114284.html), >20 U/mg sólido (https://www.creative-enzymes.com/product/lactate-oxidase-from-aerococcus-iridans-recombinant_752.html) and ≥ 50 U/mg proteína (<https://www.usbio.net/molecular-biology/L3000-10B>). Si bien es difícil comparar las actividades enzimáticas si no están medidas en idénticas condiciones experimentales, la actividad específica de nuestra rLOX purificada ($\cong 250$ U/mg) se encuentra entre las mejores reportadas tanto en la literatura como por los fabricantes comerciales.

El uso industrial de la enzima LOX requiere una producción a gran escala. En este trabajo, se produjo la rLOX en biorreactor mediante un cultivo *fed-batch* y se obtuvo un rendimiento (300 mg de rLOX purificada/l) aproximadamente diez veces superior en comparación con la escala de Erlenmeyer (30-35 mg de rLOX purificada/l). Es de suma importancia adaptar el medio de cultivo de acuerdo con las necesidades individuales de cada procedimiento (Galbraith et al., 2018). Está reportado que mayores niveles de proteínas recombinantes pueden ser producidos en presencia de magnesio en *E. coli* (Mahmoudi et al., 2012). En nuestro estudio, los experimentos iniciales de *fed-batch* se llevaron a cabo en un medio M9 modificado y una solución de alimentación descrita previamente para una alta producción de proteínas recombinantes ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g/l y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 20 g/l, respectivamente) (Babaeipour et al., 2013). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, el magnesio condujo a la formación de una gran cantidad de precipitado salino insoluble, que afectó el procesamiento posterior de la proteína (*downstream*). La optimización de la composición del medio de cultivo y de la alimentación mediante la reducción de la concentración de magnesio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/l para el medio y $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/l para la solución de alimentación) fue esencial para evitar este precipitado y permitió realizar un proceso de *downstream* adecuado. Esta fue una optimización inicial y probablemente el proceso *fed-batch* se podría seguir mejorando para lograr mejores niveles de producción.

Previamente, se reportó la expresión de una LOX recombinante (*A. Viridans*), sin etiqueta de afinidad, a escala de biorreactor (Maeda-Yorita et al., 1995). Sin embargo, como la LOX recombinante no contenía etiqueta de afinidad, se requirieron varios pasos para la purificación de la proteína. A partir de nuestros experimentos en biorreactor, se purificó eficientemente una rLOX de alta pureza después de un único paso de purificación por afinidad. La etiqueta de His-tag permitió un proceso de purificación fácil y altamente eficiente y no afectó la estabilidad y el funcionamiento de la proteína en comparación con una enzima LOX comercial sin etiqueta.

En conclusión, expresamos y purificamos una LOX de *A. viridans* recombinante marcada con His-tag N-terminal en *E. coli* y demostramos que es completamente funcional en un kit de diagnóstico y en un biosensor amperométrico. Escalamos la producción de la LOX de *A. viridans* recombinante en un cultivo *fed-batch* y la purificamos en un solo paso de cromatografía de afinidad. Este es un proceso simple, rápido y económico para la producción

de una enzima LOX recombinante que se usa ampliamente en las industrias farmacéutica, de alimentos y bebidas.

II.4. MATERIALES Y MÉTODOS

II.4.1. Plásmido de expresión

La proteína LOX recombinante etiquetada con un His-tag N-terminal se expresó a partir del plásmido pET50b-LOX. Este vector de expresión contiene la secuencia codificante de la LOX de *A. viridans* (ID de secuencia de la proteína: WP_003142047.1). Las secuencias codificantes de la etiqueta N-terminal de 6 histidinas (Taurino et al., 2013) y de la proteína LOX fueron sintetizadas comercialmente, el uso de codones fue optimizado para la expresión en *E. coli* y clonados en el vector pET50b (Novagen; Merck KGaA; Darmstadt, Alemania) (GenScript, <https://www.genscript.com/>). La cepa de expresión *E. coli* BL21 (λ DE3) (Novagen) se transformó con este plásmido.

II.4.2. Expresión y purificación de la proteína

Las células de *E. coli* transformadas con el plásmido pET50b-LOX se cultivaron a 37 °C con agitación en 500 mL de medio LB suplementado con kanamicina (25 μ g/mL) hasta una DO₆₀₀ de 0,6-0,8. La expresión de proteína recombinante se indujo mediante la adición de IPTG 0,4 mM, seguido de una incubación durante la noche a 22 °C, con agitación. Posteriormente, se colectaron las células, se resuspendieron en 20 mL de buffer de unión (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, NaCl 500 mM, glicerol al 15 %) y se lisaron mediante homogeneización a alta presión (Avestin Emulsiflex C3). Los sobrenadantes de los lisados centrifugados se incubaron con 1 mL (volumen de cama) de resina de agarosa Ni-NTA (Qiagen, Hilden, Alemania) a 4 °C con agitación. Las proteínas no unidas se eliminaron lavando, con 40 volúmenes de cama de buffer de unión, que contenía concentraciones crecientes de imidazol (0, 20, 40, 60 y 80 mM). La proteína rLOX con His-tag se eluyó usando imidazol 400 mM (Correa et al., 2011). La proteína rLOX purificada se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bio-Rad Bradford Protein Assay; Hercules, CA, EE. UU.) y se analizó mediante SDS-PAGE (15 %).

II.4.3. Caracterización funcional en un kit diagnóstico

El kit comercial de Lactate (Wiener Laboratorios SAIC, Rosario, Argentina, <https://www.wiener-lab.com.ar/>) consta de dos reactivos: Reactivo A y Reactivo B. El Reactivo A contiene TOOS 3,5 mM, ascorbato oxidasa (de pepino) ≥ 30 U/mL, tampón fosfato 100 mM pH 7,8 y azida sódica $< 0,1\%$. El reactivo B contiene, 4-aminoantipirina 5 mM, lactato oxidasa ≥ 10 U/mL, peroxidasa de rábano picante ≥ 24 U/mL, tampón fosfato 100 mM pH 7,8 y azida sódica $< 0,1\%$. Este Reactivo B está formulado con una LOX de *A. viridans* recombinante comercial, sin etiqueta de afinidad, producida en *E. coli* (actividad específica ≥ 55 U/mg de proteína).

Con nuestra rLOX (actividad específica \cong 250 U/mg) se preparó un reactivo B equivalente al del kit comercial. El buffer de nuestra rLOX purificada se intercambió utilizando una columna de desalado PD-10 (GE Healthcare) previamente equilibrada con un Reactivo B, sin la LOX comercial (4-aminoantipirina 5 mM, peroxidasa de rábano picante \geq 24 U/mL, buffer fosfato 100 mM pH 7,8 y azida de sodio $<0,1\%$, elaborado por Wiener Laboratorios SAIC). Finalmente se ajustó la concentración de rLOX a 0,039 mg/mL con este Reactivo B (sin LOX comercial). Se utilizaron, tanto el Reactivo B comercial como el Reactivo B que contiene nuestra rLOX, para realizar la reacción enzimática del kit, la cual se llevó a cabo siguiendo las especificaciones del fabricante (Prospecto del kit Lactate, https://www.wiener-lab.com.ar/VademecumDocumentos/Vademecum%20espanol/lactate_sp.pdf). Se utilizaron tres estándares de concentración de lactato (11,9, 23,8 y 35,7 mg/dl) para realizar las reacciones. Después de 7 min de incubación, se midió la absorbancia a 540 nm. Además, se llevó a cabo un ensayo de estabilidad acelerada. El Reactivo B comercial y el Reactivo B que contiene nuestra rLOX se incubaron a 37 °C durante 45 días. La actividad de los Reactivos B se analizó periódicamente como se describió anteriormente, utilizando el estándar de concentración de lactato más alto (35,7 mg/dl). El reactivo B sin lactato oxidasa comercial y el kit completo de diagnóstico comercial fueron proporcionados por Wiener Laboratorios SAIC. Estos experimentos se realizaron por duplicado y los datos se analizaron mediante la prueba t de Student.

II.4.4. Caracterización funcional en un biosensor

Los biosensores NovoSens (NovoSens, Córdoba, Argentina, <https://novosens.com/>) consisten en un transductor electroquímico al que se unen covalentemente las enzimas de interés. NovoSens construyó dos tipos de biosensores: uno con nuestra rLOX (actividad específica \cong 250 U/mg) y otro con una LOX comercial (Sigma-Aldrich, EE. UU. Cat N° L9795, actividad ≥ 20 U/mg sólido), que es una enzima nativa (no recombinante y sin etiqueta de afinidad) obtenida de *A. viridans*. Construyeron dos biosensores para cada enzima, los cuales contenían las mismas unidades enzimáticas de cada enzima. Luego, analizaron los parámetros analíticos (sensibilidad, tiempo de respuesta, límite superior de linealidad y límite de detección). Para esto, realizaron una curva de calibración agregando cinco veces una solución estándar de lactato 100 μ M, seguida de otras cinco adiciones de una solución estándar de lactato 1000 μ M. En esta etapa determinaron el tiempo de respuesta para la primera de cada adición, así como el tiempo transcurrido entre la adición del estándar y la estabilización de la respuesta de la corriente eléctrica. Los incrementos en la corriente eléctrica se midieron y representaron frente a la concentración final de lactato en cada paso. El límite superior de linealidad lo determinaron como la concentración más alta a la que se mantuvo un modelo lineal. La sensibilidad se calculó como la pendiente de la línea. El límite de detección fue la concentración de lactato más baja a la que se observó una respuesta, y se obtuvo empíricamente agregando estándares que oscilaban entre 1 μ M y 20 μ M de lactato.

También evaluaron la estabilidad de los biosensores a lo largo del tiempo. Los parámetros analíticos los determinaron semanalmente durante un período de 12 semanas. A la vez evaluaron el efecto del pH sobre los parámetros analíticos utilizando valores de pH de 6,5; 7,0; 7,5 y 8,0.

Se evaluaron la respuesta de los biosensores construidos con rLOX en un yogur comercial (Tregar S.A., Argentina). La concentración de ácido láctico del yogur la midieron usando una dilución 1/1,000 del yogur en agua y una solución estándar de ácido láctico (100 μ M). Se utilizó un transductor electroquímico no funcionalizado (sin enzima) como control negativo.

II.4.5. Producción de proteína en biorreactor

II.4.5.1. Medio y soluciones

Se utilizó el medio modificado M9 (Babaeipour et al., 2013) para la preparación del pre-inóculo. El cultivo *fed-batch* se llevó a cabo en el mismo medio modificado M9, con una variación, la concentración final de magnesio se redujo diez veces. Así, el medio M9 optimizado bajo en Mg contiene (g/l): glucosa, 10; K_2HPO_4 , 15; KH_2PO_4 , 7,5; ácido cítrico, 2; $(NH_4)_2SO_4$, 2,5; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2; y 1 mL de solución de elementos traza por litro. La solución de elementos traza constaba de 2,8 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 2 g $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 2,8 g $CoSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,5 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,2 g $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ y 0,3 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ por litro de HCl 1 M. Se usó una solución de alimentación baja en Mg en la etapa *fed-batch*. La solución de alimentación contiene 350 g/l de glucosa, 1 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y 2,5 mL de solución de elementos traza l^{-1} . Las soluciones de glucosa y $MgSO_4$ se esterilizaron por separado.

II.4.5.2. Etapa *batch* del cultivo en biorreactor

El cultivo *batch* se llevó a cabo en un biorreactor Biostat A (Sartorius Stedim, Goettingen, Alemania), equipado con un tanque agitado de 2 L, un sistema de control y de registro de datos. El cultivo *batch* inicial comenzó con la adición de 5 mL de un cultivo ON (pre-inóculo) ($DO_{600} = 0,8 \pm 0,1$) en un biorreactor que contenía 500 mL de medio de cultivo suplementado con kanamicina (25 μ g/mL). Las células se cultivaron a 29 °C con una velocidad de agitación inicial de 700 rpm y un flujo de aire de 0,6 L min^{-1} . El pH se mantuvo automáticamente a 6,8 mediante la adición de soluciones de H_3PO_4 1,5 M o NH_4OH al 25 % (p/v). El oxígeno disuelto (OD) se reguló automáticamente y se mantuvo al 20 % de saturación mediante el control del flujo de aire y la velocidad de agitación.

II.4.5.3. Etapa *fed-batch* del cultivo en bioreactor

La alimentación se realizó utilizando una bomba peristáltica externa después de que transcurrieran las primeras 20 h del cultivo *batch*. El cultivo se inició con una etapa *batch* y luego se procedió a la etapa *fed-batch* cuando la glucosa inicial se había consumido casi por completo (indicado por el rápido aumento en la concentración de OD). El proceso *fed-batch* se inició a 27 °C y el OD se mantuvo al 20% de saturación, mediante la regulación del suministro de aire y la velocidad de agitación. Se utilizó un perfil de alimentación durante 2,5 h, a lo largo de las cuales, el flujo de la solución de alimentación se incrementó de 5 a 11,5 mL/h. Cuando la DO₆₀₀ alcanzó 23, se añadió IPTG 1 mM para la inducción de la proteína recombinante y la temperatura del cultivo se redujo a 19 °C. El flujo de la solución de alimentación se redujo y se mantuvo constante a 5 mL/h durante la inducción. Se tomaron muestras periódicamente para determinar la glucosa residual y el crecimiento celular. La glucosa se analizó enzimáticamente con el kit Glicemia (Wiener Laboratorios SAIC, Argentina). El crecimiento celular se determinó midiendo la densidad óptica del cultivo a 600 nm (OD₆₀₀). El peso celular seco (g/l) se determinó al final del cultivo *fed-batch*, centrifugando los cultivos de las muestras y secando las células lavadas hasta un peso constante. Las células totales se recolectaron después de la inducción para la purificación de la rLOX y su caracterización funcional. La rLOX se purificó y posteriormente se analizó en el kit Lactate como se describe en las secciones II.4.2 y II.4.3, respectivamente.

CAPÍTULO III

EXPRESION, PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE LA PROTEINA ALFA-GALACTOSIDASA A HUMANA Y DE MUTANTES CON POTENCIAL ACTIVIDAD TERAPÉUTICA MEJORADA



En este capítulo se desarrolló el objetivo específico tres, que abordó la expresión de la proteína terapéutica alfa-galactosidasa A humana en célula de mamíferos en cultivo, y el diseño y caracterización de nuevas variantes de la misma que podrían mejorar el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

III.1. INTRODUCCIÓN

El avance creciente en el área biotecnológica, ha permitido el desarrollo y la producción de proteínas recombinantes que son utilizadas en el tratamiento de diferentes enfermedades, y estos productos son denominados genéricamente como biofármacos. Los biofármacos se producen en organismos vivos mediante el uso de tecnología de ADN recombinante, incluida la selección y clonado del gen de interés, y el uso de un vector que es transferido a un sistema de expresión, o célula huésped viva. Por lo tanto, este tipo de productos se distingue de los productos biológicos clásicos obtenidos a partir de material biológico, como fluidos, tejidos humanos o animales, o microorganismos silvestres (Kesik-Brodacka, 2018).

Los biofármacos se han convertido en un componente central de la farmacoterapia moderna, representando casi un tercio de las ventas de productos farmacéuticos (Dos Reis et al., 2016; Lagassé et al., 2017). Desde el punto de vista comercial el mercado mundial de proteínas recombinantes fue valorado en 2,2 billones de dólares en el año 2020 y se proyecta que alcanzará los 4,1 billones en 2025, siendo el desarrollo de fármacos basados en proteínas recombinantes el componente principal de este mercado (Markets and Markets, 2021; Schillberg et al., 2019). Debido a su elevada complejidad de producción, los biofármacos se encuentran entre los medicamentos más caros del mercado. Los costos de la industria farmacéutica destinados en las etapas de investigación, desarrollo y proceso de producción de estos productos se traducen posteriormente en altos costos para los usuarios, dificultando entonces el acceso a la terapia (Dos Reis et al., 2016; Lagassé et al., 2017).

Cuando la patente de un desarrollo biofarmacéutico innovador caduca, la competencia puede producir libremente compuestos similares, denominados "biosimilares". Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los biosimilares se definen como productos biotecnológicos que son comparables en cuanto a calidad, evaluación clínica y no clínica, con un producto de referencia ya aprobado. Una molécula biosimilar debe demostrar similitudes en farmacocinética, farmacodinámica, seguridad y eficacia con el biológico innovador (Kapur et al., 2022). El objetivo de los biosimilares es ofrecer opciones de tratamiento relativamente menos costosas, más disponibles y asequibles y, en general, mejorar el acceso a la terapia, manteniendo la actividad biológica y el perfil de seguridad similar al biológico de referencia (Honavar, 2021).

Otro grupo interesante dentro de los biofármacos son los biomejorados o *biobetters*, los cuales han sido estructural y/o funcionalmente alterados para lograr un desempeño clínico mejorado o diferente, en comparación con los productos de referencia aprobados (Kesik-Brodacka, 2018). Los biomejorados surgen de una investigación científica para crear un mecanismo de acción mejorado terapéuticamente beneficioso, o una mejora en la potencia, un aumento de la biodisponibilidad, vida media más larga, mejor seguridad y menor inmunogenicidad, o una eficacia mejor y más amplia. El alcance de los

biomejoradores es esencialmente para tratar a pacientes refractarios, o con recaídas, o aquellos que tienen sistemas de dosificación inconvenientes, o problemas de seguridad (Honavar, 2021). De acuerdo con las regulaciones, los biomejorados se tratan como diferentes a los productos existentes y, por lo tanto, se evalúan como nuevos medicamentos en un procedimiento de aprobación estándar (Kesik-Brodacka, 2018).

Durante la última década, una nueva era de innovación liderada por compañías biofarmacéuticas, ha traducido la ciencia básica en una creciente cartera de nuevos medicamentos innovadores, lo que ha llevado a un progreso notable para los pacientes con enfermedades raras. Por definición, una enfermedad rara o “huérfana” es aquella cuya prevalencia es inferior a 5 casos por cada 10.000 personas (Nguengang Wakap et al., 2020).

Las enfermedades de depósito lisosomal (LSDs) son una familia de más de 70 enfermedades monogénicas raras, que típicamente se presentan en la infancia o niñez y afectan colectivamente a 1 de cada 5.000 nacidos vivos (Platt, 2018). Sin embargo, algunas tienen inicio en la edad adulta, y como son frecuentemente mal diagnosticadas, es probable que sean más frecuentes de lo que se cree actualmente. En estas enfermedades la mutación en un gen que codifica una proteína lisosomal, da como resultado una falla lisosomal y la subsiguiente acumulación constante de sustratos no digeridos en el lisosoma, lo que finalmente conduce a la disfunción y muerte celular (Platt, 2018). Durante muchos años, las LSDs se consideraron objetivos poco atractivos para el desarrollo de terapias debido a su baja prevalencia. Sin embargo, el desarrollo y éxito de la primera terapia biológica comercial para una LSD, la ERT para la enfermedad de Gaucher tipo 1, junto con incentivos regulatorios, sirvieron para apoyar y promover el desarrollo comercial de terapias para otras enfermedades huérfanas. La ERT consiste en reemplazar por vía intravenosa la enzima que es deficiente o está ausente en el cuerpo, con una enzima recombinante (Ries, 2017). El desarrollo de productos biológicos para las LSDs ha hecho que sea más importante que nunca que los pacientes con estas enfermedades estén correctamente diagnosticados y tratados tan pronto como sea posible para maximizar el beneficio terapéutico (Platt, 2018).

Sin embargo, la formación de anticuerpos neutralizantes sigue siendo una preocupación en todos los productos de la ERT. La biodistribución también representa un problema, incluso para las ERT más efectivas, lo que a menudo resulta en una eficacia desequilibrada. Además, la barrera hematoencefálica es un gran obstáculo para llevar las proteínas recombinantes utilizadas en ERT al sistema nervioso central, dejando una gran necesidad clínica insatisfecha en las LSDs que involucran el cerebro, lo que significa las dos terceras partes de todas las LSDs. Por último, pero no menos importante, los productos biológicos para ERT se encuentran entre los medicamentos más caros en la actualidad, con un costo anual por paciente oscilando desde \$200,000 hasta \$375,000 en promedio para toda su vida (García Fernández & Ortiz Mellet, 2019; Schuller et al., 2015).

La enfermedad de Fabry (FD, por sus siglas en inglés) es una LSD hereditaria ligada al cromosoma X. La causa de la enfermedad es la mutación del gen que codifica la enzima alfa-

galactosidasa A (GLA), lo que conduce a una pérdida total o parcial de su función. La GLA es una enzima lisosomal y es responsable de hidrolizar los grupos terminales alfa-galactosil de glicolípidos y glicoproteínas. Su sustrato principal es la globotriaosilceramida (Gb3), un glicoesfingolípido que consiste en una ceramida unida a una cadena de azúcares, formada por una glucosa y dos galactosas. Cuando la Gb3 no se metaboliza correctamente, se acumula principalmente en los lisosomas, siendo las células endoteliales uno de los tipos celulares más afectados. Como resultado comienzan a manifestarse diferentes signos y síntomas asociados a la enfermedad (Germain, 2010).

La FD se considera una enfermedad atenuada en los pacientes que sobreviven hasta la edad adulta. Sin embargo, aquellos que pierden completamente la actividad de la GLA tienen una esperanza de vida más corta. Los pacientes con FD presentan un amplio y diverso espectro de manifestaciones clínicas, que van desde la clásica enfermedad en hombres hasta una enfermedad asintomática en mujeres, con numerosas variantes entre estos dos extremos (Passaglia Bernardes et al., 2020). Hasta la actualidad, se han descrito más de 1.000 mutaciones diferentes en el gen que codifica para la GLA (Stenson et al., 2003).

Los hombres son hemicigotas para la mutación patogénica, al tener solo un cromosoma X, por lo que generalmente desarrollan signos y síntomas más severos. Como resultado, el fenotipo más severo o “fenotipo clásico” ocurre predominantemente en hombres y se caracteriza por una actividad residual nula o mínima de la enzima. Sin embargo, a diferencia de otros trastornos ligados al cromosoma X, las mujeres pueden experimentar síntomas significativos de la enfermedad dependiendo de la actividad residual de su enzima GLA (Simonetta et al., 2018).

Las terapias disponibles actualmente no son curativas, ya que solo retrasan la progresión de la enfermedad, además de presentar varias limitaciones. Actualmente, dos enfoques terapéuticos están aprobados para el tratamiento de la FD: la ERT y la terapia con chaperonas farmacológicas (PCT) (Modrego et al., 2021). La ERT consiste en administrar por vía intravenosa la enzima GLA recombinante. De esta manera, es posible reemplazar la enzima que está ausente o deficiente y eliminar o reducir la acumulación de Gb3 (Ohashi, 2019).

El transporte de la enzima a los lisosomas está mediado por los receptores de manosa-6-fosfato (M6PR). Los residuos de manosa-6-fosfato (M6P) sirven como señales de reconocimiento para los receptores de M6P (M6PR), que transportan la GLA a endolisosomas en vesículas recubiertas de clatrina, a través de las vías dependiente (CD) e independiente de cationes (CI). Mientras que el sistema CD-M6PR parece actuar intracelularmente (es decir, en la red trans-Golgi al endosoma temprano), el mecanismo CI-M6PR puede mediar el transporte de la GLA desde el TGN, así como desde la superficie celular, lo que ayuda a recuperar a la GLA secretada. Una vez en los endosomas, el complejo GLA-M6PR se disocia en el ambiente ácido y los receptores se reciclan a sus compartimentos

de origen (membrana plasmática y/o TGN). Es mediante esta última vía, CI-M6PR, que la GLA recombinante puede ingresar a los lisosomas cuando se realiza la ERT.

A nivel mundial, sólo existen dos productos comerciales de la GLA humana recombinante: uno es Replagal, de la farmacéutica Shire, y el otro es Fabrazyme, de Sanofi Genzyme. El primero se produce por sobreexpresión en fibroblastos humanos y el segundo en células derivadas de ovario de hámster chino (CHO). Los dos se administran por vía intravenosa, cada dos semanas (la dosis de Replagal es de 0,2 mg/kg y la de Fabrazyme es de 1 mg/kg). Ambos tratamientos dan como resultado la reducción de los niveles plasmáticos y urinarios de Gb3, así como la disminución del almacenamiento de glicoesfingolípidos en los lisosomas. La respuesta a la ERT en los pacientes puede verse influenciada por varios factores, siendo uno importante la formación de anticuerpos antidrogas (ADAs). Un alto porcentaje de pacientes con enfermedad de Fabry carecen completamente de la enzima GLA; por lo tanto, cuando se administra la enzima recombinante, el sistema inmunitario la reconoce como ajena, desencadenando una respuesta inmune. La aparición de ADAs puede influir negativamente en la eficacia a largo plazo del tratamiento (Stappers et al., 2020). Además de la formación de ADAs, la ERT para la enfermedad de Fabry presenta otras limitaciones. Tiene una penetración tisular limitada y carece de eficacia si se inicia en etapas avanzadas de la enfermedad. Además, la GLA no atraviesa la barrera hematoencefálica y puede inducir reacciones adversas a la administración intravenosa. Finalmente, la ERT es una terapia de por vida que requiere administración intravenosa cada 2 semanas, asociada a un alto costo del tratamiento (Modrego et al., 2021).

El cADN de la proteína GLA humana contiene 1290 bases y luego de la traducción, da como resultado una proteína de 429 aminoácidos que incluye un péptido señal de 31 aminoácidos (Bishop et al., 1988). En los lisosomas, la glicoproteína se presenta como un homodímero (~101 kDa). Cada monómero contiene tres sitios de N-glicosilación, cinco puentes disulfuro y dos residuos de cisteína desapareados (C90 y C174) (Garman & Garboczi, 2004).

La GLA humana posee cuatro sitios potenciales de N-glicosilación (N139, N192, N215 y N408), pero sólo los tres primeros están ocupados por oligosacáridos. De estos, el tercer sitio N215 es significativamente importante para la solubilidad de la enzima, así como para su transporte desde el retículo endoplásmico a los lisosomas (Ioannou et al., 1998a), siendo el principal sitio de glicosilación afectado por las mutaciones que dan lugar a los fenotipos de la enfermedad. En la GLA humana, los oligosacáridos unidos a los sitios de glicosilación son heterogéneos, con estructuras que contienen altos niveles de manosa, así como estructuras complejas o híbridas. Además, un número significativo de los oligosacáridos tienen grupos monoéster de fosfato (Matsuura et al., 1998). Estos niveles elevados de manosa-6-fosfato en la estructura del glicano permiten que la enzima pueda ser transportada a los lisosomas a través de un receptor particular, como se explicó anteriormente.

Los puentes disulfuro juegan un rol importante en la estructura y la estabilidad de la proteína. Además, la cisteína C142 forma parte del sitio activo de la enzima, por lo que el puente disulfuro C142-C172, es también importante para la actividad enzimática. Además, las cisteínas libres también juegan un papel relevante en la estructura y función de la proteína, incluida la dimerización, catálisis enzimática, regulación redox y estabilidad térmica (Poole, 2015).

Si bien la mayoría de las mutaciones descritas hasta el presente, conducen a una GLA inactiva o con menos actividad, también se han descrito mutaciones que conducen a una GLA con propiedades mejoradas, como mayor actividad en comparación con la enzima *wild-type* (WT). Estas mutaciones no se detectaron en pacientes con FD. Diferentes trabajos que involucran la producción de mutantes recombinantes de la GLA humana, han descrito mutaciones que producen versiones mejoradas de la enzima GLA (Lukas et al., 2013; Meghdari et al., 2015; Miyamura et al., 1996; Qiu et al., 2015).

Qiu et al. (2015) produjeron GLAs recombinantes con las cisteínas libres (C90 y C174) mutadas, y las analizaron *in vitro* para comprender su papel en la estructura y función de la proteína. Algunas mutantes resultaron inactivas (C90W, C90K, C90Y, C90F, and C90R), otras manifestaron menos del 30% de actividad (C90E, C90M, C90Q, C90D, C90H, C90N, C90I, and C90L), y otras mutantes en la C90 mostraron ser más activas que la enzima WT. Estas últimas mutaciones fueron las C90T, C90V, C90A y C90S, y mostraron 187%, 181%, 153% y 119% de actividad enzimática en comparación con la GLA WT, respectivamente.

Lukas et al. (2013) analizaron un número significativo de mutaciones, para establecer una correlación con las manifestaciones clínicas e identificar nuevas mutaciones. En este estudio, dos mutaciones puntuales (N139S y R252T) mostraron actividades enzimáticas más altas que la enzima WT (148% y 117%, respectivamente). Sin embargo, la mutación N139S fue identificada en una paciente con hipertrofia septal asimétrica (ASH) (Havndrup et al., 2010). La discrepancia entre la mayor actividad de esta mutante y la manifestación de algunos síntomas relacionados con la FD exige una mayor caracterización de dicha mutante.

También se ha reportado que algunas deleciones del terminal carboxilo pueden aumentar la actividad enzimática de la GLA. Miyamura et al. (1996) produjeron mutantes con varias deleciones en el C-terminal en células COS-1 para analizar su efecto *in vitro*. En dicho trabajo, los autores observaron un incremento en la actividad enzimática cuando la deleción se produce dentro de los últimos diez residuos. En cambio, si la deleción comprende más de esos diez residuos, resulta en una pérdida drástica de la actividad de la enzima. Las actividades observadas en la GLA delecionada fueron 420%, 620%, 560%, 230%, 460%, 480%, 270% y 280% para las deleciones $\Delta 2$, $\Delta 4$, $\Delta 5$, $\Delta 6$, $\Delta 7$, $\Delta 8$, $\Delta 9$ y $\Delta 10$, respectivamente.

Una caracterización adicional de las mutantes conteniendo deleciones en el extremo carboxilo terminal, se llevó a cabo por Meghdari et al. (2015). Las enzimas con deleciones de 2, 4, 6, 8 y 10 aminoácidos C-terminales ($\Delta 2$, $\Delta 4$, $\Delta 6$, $\Delta 8$ y $\Delta 10$), se expresaron en *Pichia*

Pastoris y se purificaron para realizar ensayos enzimáticos cuantitativos. Los resultados mostraron un aumento en la k_{cat} y V_{max} , con las deleciones de 2, 4, 6 y 10 aminoácidos. Sin embargo, la eliminación de 8 aminoácidos C-terminales disminuyó la k_{cat} respecto de la GLA WT. Las discrepancias entre esta mutante $\Delta 8$ con lo reportado anteriormente por Miyamura et al., podría deberse a las diferencias de los sistemas experimentales utilizados en cada trabajo. Meghdari et al. (2015) utilizó *P. Pastoris* como sistema de expresión, mientras que en el trabajo de Miyamura et al. se utilizaron células COS-1. Por lo tanto, podrían existir diferencias en las modificaciones postraduccionales de la GLA que afecten específicamente a la actividad/estabilidad de esta mutante en cada sistema de expresión, así como la presencia de otras proteínas en el citoplasma de *P. pastoris* o células COS-1, que podrían interactuar con la proteína afectando su actividad catalítica (Modrego et al., 2021).

De esta manera, la eliminación de algunos residuos de la secuencia C-terminal de la GLA WT, daría como resultado un aumento significativo en la actividad enzimática. Además, cabe señalar que los productos comerciales Replagal como Fabrazyme, muestran cierto grado de heterogeneidad C-terminal, con especies truncas que carecen de uno o dos residuos en el C-terminal (Lee et al., 2003).

En resumen, la existencia de mutantes con mayor actividad enzimática, plantea la posibilidad de estudiar mutaciones o combinaciones de las mismas que puedan conducir a GLAs mejoradas para una ERT más eficiente. Además, se esperaría que las enzimas mutadas con mayor actividad superen el efecto inhibitorio de los anticuerpos sobre la eficacia del tratamiento, ya que permitiría utilizar menores dosis y frecuencia de administración. Por lo tanto, se requiere un mayor análisis y caracterización de las mutaciones mencionadas, así como la investigación de nuevas mutaciones con propiedades similares, para determinar la mejora que supondría el uso de dichos mutantes en la ERT.

Este capítulo se abordan dos aspectos: uno es la expresión de la proteína GLA en células de mamífero en cultivo como etapa inicial para la potencial producción de un biosimilar; y el otro es la búsqueda y análisis de mutantes de la proteína GLA más activas y/o con propiedades mejoradas.

Como se comentó anteriormente, un biosimilar de la GLA es de gran interés ya que actualmente sólo hay disponibles dos productos comerciales a nivel mundial, los cuales son altamente costosos y no se producen en nuestro país.

Por otro lado, con el objeto de contribuir no sólo en el aspecto productivo, sino también en un desarrollo innovador, planteamos la búsqueda de mutantes de la GLA más activas como potenciales proteínas terapéuticas mejoradas. Esta estrategia permitiría sobrellevar algunas limitaciones y brindar una alternativa mejorada a la actual ERT. Este objetivo se desarrolló en colaboración con el Dr. José Luis Corchero (Grupo de Nanobiotecnología, Unidad de Proteómica e Ingeniería de Proteínas, Instituto de biotecnología y biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona, IBB-UAB) y la participación de la Dra. Agustina Godino.

III.2. RESULTADOS

III.2.1. Producción de la proteína GLA WT en células de mamífero en cultivo

III.2.1.1. Diseño del vector de expresión de la GLA WT

Para la expresión de la proteína GLA, diseñamos dos construcciones que contienen la secuencia codificante de la misma (**Figura III-1A y -1B**). Una construcción, contiene la secuencia codificante natural de la GLA humana junto con su péptido señal (*gla*, con el uso de codones humanos naturales). La segunda construcción, contiene el péptido señal de la GLA nativa de células CHO y la secuencia codificante de la proteína GLA humana, a la cual se le optimizó el uso de codones para su expresión en células CHO (*gla**). Esta modificación tiene como finalidad evaluar si la expresión de la proteína es mayor o mejorada en las células CHO, cuando se optimiza el uso de codones del gen para su expresión en estas células, y/o si el transporte de la proteína al retículo y su posterior glicosilación es más efectiva. Como control de la transfección y expresión de proteínas en este sistema de células de mamífero en cultivo, se utilizó un constructo que expresa la desoxirribonucleasa I (DNasa I) (**Figura III-1C**), proteína que se utiliza para el tratamiento de pacientes con Fibrosis Quística, cuyo biosimilar está siendo generado por la Dra. Agustina Godino, también integrante de nuestro grupo de trabajo.

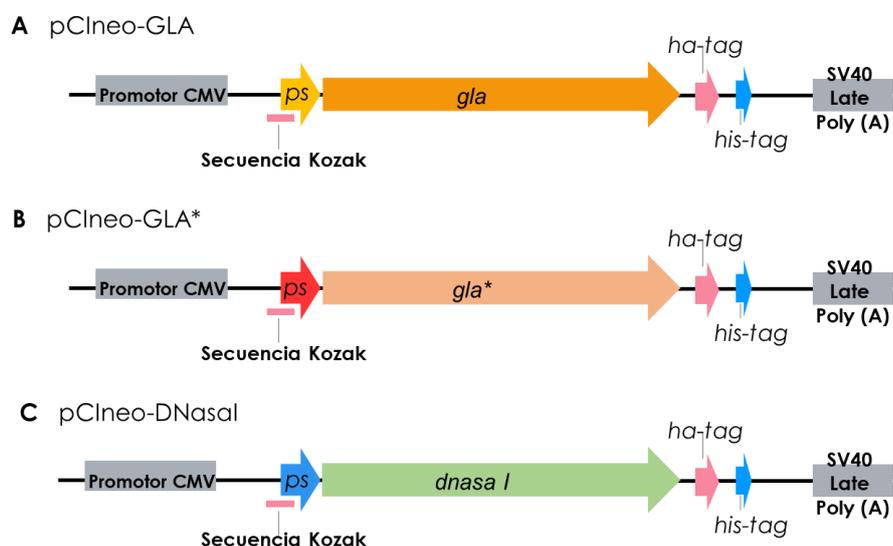


Figura III-1. Plásmidos de expresión para las proteínas recombinantes GLA (A, secuencia de nucleótidos no optimizada), GLA* (B, secuencia de nucleótidos optimizada para su expresión en células CHO-K1) y la proteína control DNasa I (C). Promotor CMV: Promotor del citomegalovirus humano. SV40 Late Poly (A): Señal de poliadenilación. *ps*, en amarillo: región codificante del péptido señal de la proteína GLA humana; en rojo: región codificante péptido señal de la proteína GLA nativa de células CHO; en azul: región codificante del péptido señal de la proteína DNasa I humana. *his-tag*: región codificante de la etiqueta de afinidad His-tag. *ha-tag*: región codificante de la etiqueta HA.

III.2.1.2. Expresión de la proteína GLA WT en células CHO-K1 adheridas

La enzima recombinante GLA humana, en sus dos variantes de uso de codones (rhGLA no optimizada y rhGLA* optimizada), y la enzima control DNasa I humana (rhDNasa I), se expresaron por 24 hs de manera transiente en las células CHO-K1 adheridas, siguiendo la metodología explicada en Materiales y Métodos (sección III.4.2).

La expresión de las proteínas de interés se corroboró mediante inmunotinción de las células transfectadas y visualización bajo microscopio confocal de fluorescencia (**Figura III-2A**). Además, se realizó un extracto total de proteínas el cual se analizó por *Western blot* utilizando anticuerpo primario anti-HA (**Figura III-2B**). Bajo estas condiciones experimentales, la rhGLA se observó como una banda de proteína mayoritaria de aproximadamente 50 kDa (**Figura III-2B**). Lo mismo ocurrió con la proteína control rhDNasa I, donde se observó una banda de proteína predominante a la altura de los ≈ 37 kDa. En el caso de la rhGLA*, cuya secuencia de nucleótidos fue optimizada para la expresión en células CHO-K1, si bien se observó una banda a la altura de ≈ 50 kDa, estaba acompañada de varias bandas de menor peso molecular, lo que podría indicar la presencia de versiones de la proteína parcialmente glicosiladas y/o parcialmente clivadas o degradadas. Por lo tanto, los experimentos siguientes fueron realizados con la proteína rhGLA.

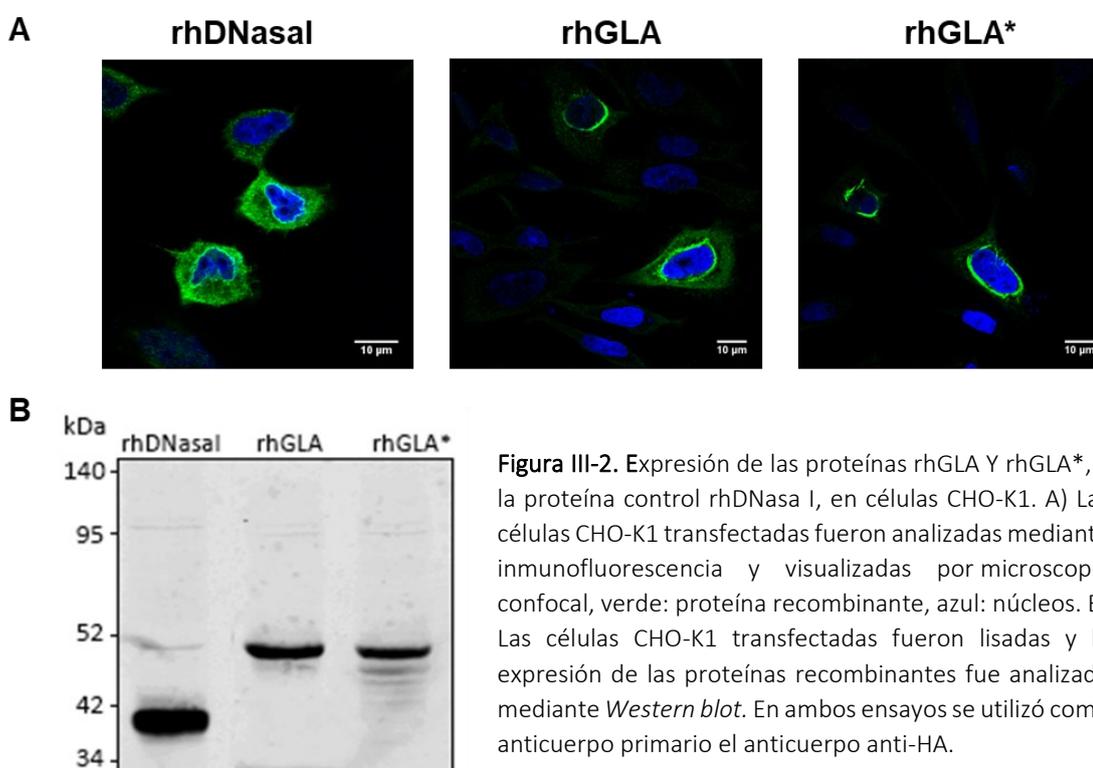


Figura III-2. Expresión de las proteínas rhGLA Y rhGLA*, y la proteína control rhDNasa I, en células CHO-K1. A) Las células CHO-K1 transfectadas fueron analizadas mediante inmunofluorescencia y visualizadas por microscopía confocal, verde: proteína recombinante, azul: núcleos. B) Las células CHO-K1 transfectadas fueron lisadas y la expresión de las proteínas recombinantes fue analizada mediante *Western blot*. En ambos ensayos se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo anti-HA.

III.2.1.3. Análisis de la N-glicosilación de la proteína GLA WT mediante el uso de tunicamicina

La tunicamicina es un antibiótico que inhibe la N-glicosilación de proteínas en el retículo endoplásmico. Inhibe la transferencia de N-acetilglucosamina-1-fosfato a dodecil fosfato, el primer paso en el ensamblaje de la cadena de oligosacáridos de las glicoproteínas. Por este motivo, fue utilizado para evaluar la glicosilación de nuestra proteína de interés. Como control en este ensayo, se utilizó nuevamente la proteína rhDNasa I, la cual también posee glicosilaciones. Como se explica en Materiales y Métodos (sección III.4.3), las células CHO-K1 transfectadas fueron incubadas en presencia o ausencia de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina por 14hs. Posteriormente, se realizó un extracto total de proteína y se analizó por *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-HA. Los resultados obtenidos muestran una diferencia en la migración de las bandas proteicas provenientes de las células no tratadas (control) en comparación con las células tratadas. Las proteínas recombinantes proveniente de células tratadas con tunicamicina tienen un peso molecular menor que las provenientes de células no tratadas, poniendo así de manifiesto la presencia de N-glicosilaciones en la rhGLA y en la proteína control rhDNasa I, producidas (**Figura III-3**). En ambos casos, el peso molecular de la proteína no glicosilada coincide con el esperado a partir de la secuencia de aminoácidos (rhGLA 45.4 kDa y rhDNasa I 29.3 kDa).

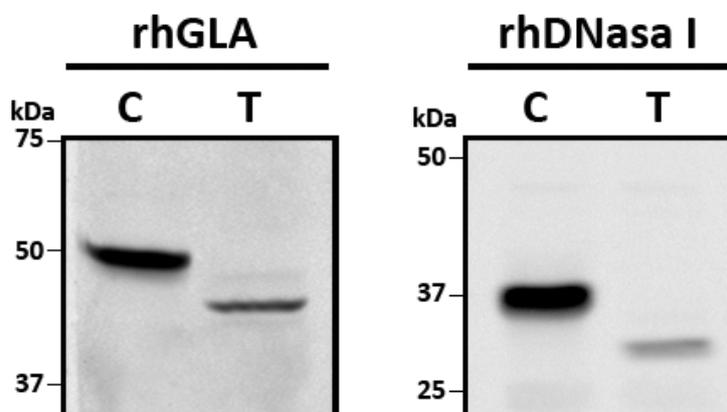


Figura III-3. Tratamiento con tunicamicina de células CHO-K1 transfectadas con los plásmidos de expresión de la proteína GLA y de la proteína control DNasa I. Las células transfectadas se incubaron con tunicamicina (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 14 h (T). Las células transfectadas e incubadas sin tunicamicina se usaron como control (C). Las muestras de extracto total de proteína se analizaron por *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-HA.

III.2.2. Búsqueda y análisis de mutantes de la proteína GLA más activas

Como se describió previamente en la introducción de este capítulo, existen algunos trabajos científicos que reportaron mutaciones en la GLA, cuyas actividades enzimáticas serían superiores a las de la proteína GLA WT. Para estas mutantes se han reportado actividades que van desde el 117% al 620% (Lukas et al., 2013; Miyamura et al., 1996; Qiu et al., 2015). Todas estas mutantes fueron reportadas en diferentes sistemas de expresión, purificación y de análisis, por lo tanto, es difícil comparar claramente la actividad de cada una de ellas.

Con el objeto de poder contar con resultados obtenidos en las mismas condiciones experimentales, se eligieron cinco de estas mutantes previamente descritas en la bibliografía y se diseñaron tres nuevas mutantes de la GLA (combinando estas mutaciones individuales), las cuales fueron expresadas, purificadas y analizadas.

Este objetivo se llevó a cabo en el laboratorio del Dr. José Luis Corchero (Grupo de Nanobiotecnología, Unidad de Proteómica e Ingeniería de Proteínas, Instituto de biotecnología y biomedicina de la Universidad Autónoma de Barcelona (IBB-UAB), donde se utilizó un sistema de expresión transiente de alta eficiencia (TGE) en células HEK 293F (Corchero et al., 2011). Esta línea celular está adaptada para crecer en suspensión y en un medio de cultivo libre de suero. Este sistema permite obtener varios miligramos de la proteína de interés a partir del sobrenadante de cultivo. Además, la ausencia de suero en el medio de cultivo permite un análisis y una purificación de la proteína recombinante significativamente más sencillo. Ambas cuestiones, son sumamente relevantes teniendo en cuenta que la proteína rhGLA debe ser purificada a partir del medio extracelular.

III.2.2.1. Diseño de los plásmidos de expresión de las mutantes de la proteína GLA

Como se explica en la sección III.4.4 de Materiales y Métodos, las construcciones se realizaron en el vector de expresión pCIneo y las secuencias codificantes de las proteínas seleccionadas fueron fusionados a una etiqueta de His-tag en su C-terminal. Se seleccionaron ocho mutantes de la GLA, las cuales se esquematizan en la **Figura III-4**. Tres mutantes contienen mutaciones simples, las cuales son mutaciones puntuales donde se cambió un aminoácido por otro. Dos son deleciones en el C-terminal de la proteína, en una se eliminaron los últimos siete aminoácidos del C-terminal y en la otra, los últimos diez. El resto de las proteínas mutantes contienen mutaciones dobles, que son combinaciones de las mutaciones puntuales para evaluar si se potencia la actividad. También se realizó una construcción con la GLA WT, como control de expresión y purificación en el plásmido pCIneo.

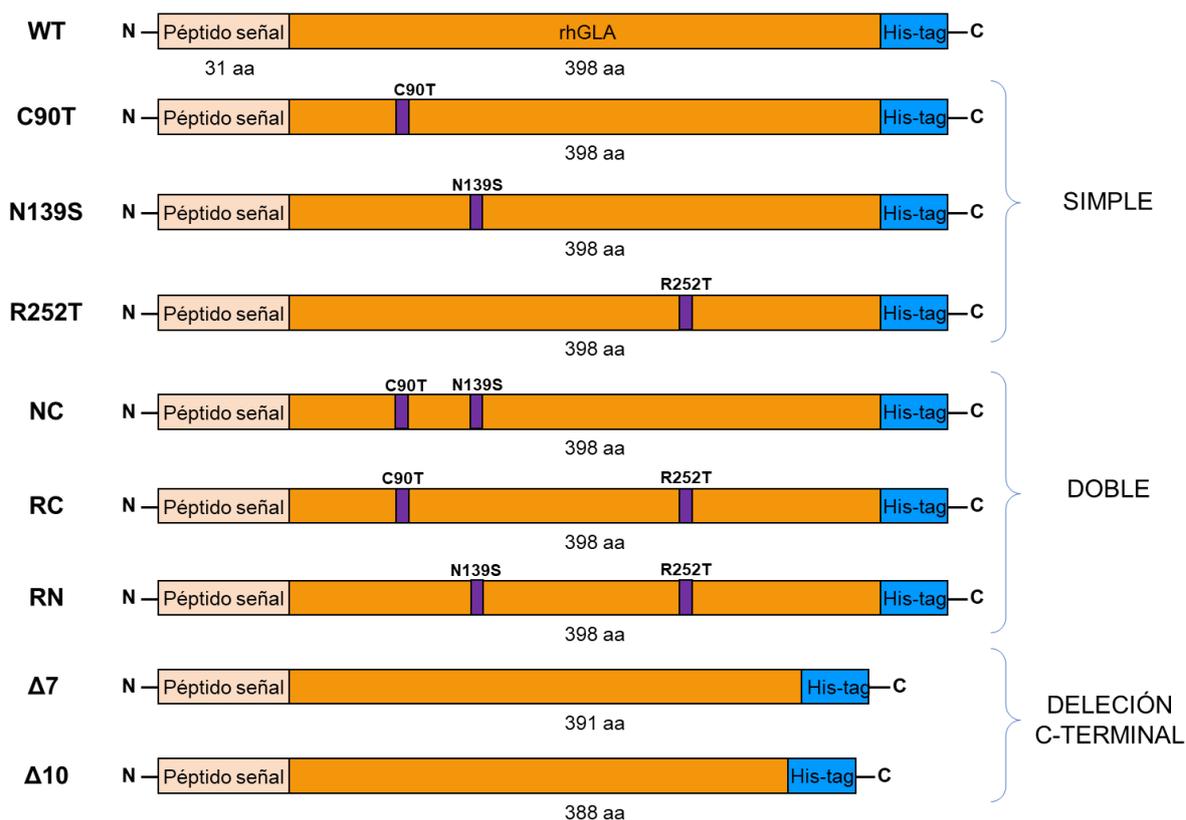


Figura III-4. Esquema representativo de la proteína rhGLA WT y las mutantes seleccionadas para ser expresadas desde el plásmido pCIneo. Tres de las proteínas mutantes contienen una mutación simple. Las otras tres mutantes contienen mutaciones dobles, combinando las mutaciones simples. Al resto de las proteínas mutantes se les eliminaron algunos aminoácidos en el C-terminal.

III.2.2.2. Expresión de las mutantes de la GLA en células HEK 293F y posterior medición de la actividad específica

Las células HEK 293F fueron transfectadas con los plásmidos conteniendo la secuencia codificante de la GLA WT o de cada una de las mutantes, como se explica en Materiales y Métodos (sección III.4.5). Luego de 6 días post-transfección, se colectaron los sobrenadantes de cultivo y posteriormente, se analizaron mediante ensayos de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-GLA.

Si bien todas las mutantes se expresaron y secretaron, algunas lo hicieron más que otras. Se observó que los mayores niveles de proteína secretada correspondían a la mutante R252T y las mutantes de delección, siendo estas últimas las que mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la GLA WT (**Figura III-5A y III-5B**).

Luego se procedió a medir la actividad específica de las mutantes en el sobrenadante clarificado (**Figura III-5C**). Este ensayo mostró que las mutantes más activas eran la R252T con un 133% de actividad, la Δ7 con un 116% de actividad y la Δ10 con 105% de actividad, considerando a la GLA WT como 100% de actividad. Los valores de actividad de las mutantes

R252T y $\Delta 7$ muestran diferencias estadísticamente significativas comparados con los valores de actividad la GLA WT.

También se observó que las mutantes C90T, N139S y sus combinaciones eran las que menor actividad presentaban y que a su vez eran las que menores niveles de proteína secretada presentaban.

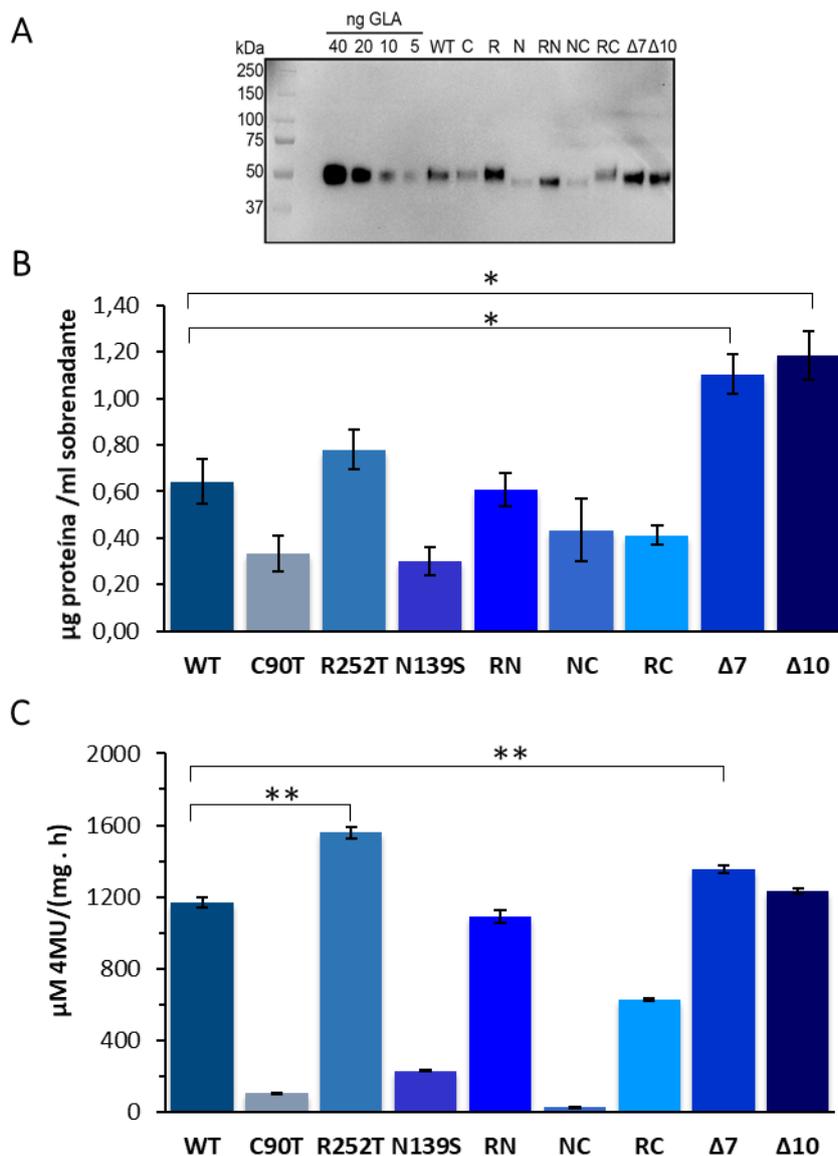


Figura III-5. Expresión de las proteínas rhGLA WT y mutantes en células HEK 293F. (A) Los sobrenadantes clarificados provenientes de células HEK 293F transfectadas con los plásmidos de expresión se analizaron mediante ensayo de *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-GLA. En los primeros carriles se observa una curva patrón con 4 diluciones de una proteína control GLA WT purificada. (B) Cuantificación del ensayo de *Western blot* correspondiente a la expresión de las mutantes. (C) Actividad específica de la rhGLA WT y de las mutantes, medida en los sobrenadantes clarificados. La actividad específica se expresó como μmol de 4-metilumbeliferona / (mg de proteína · h). Los datos correspondientes a las mutantes de la rhGLA que mostraron niveles de secreción y actividad superiores a la WT, fueron analizados mediante T-test (comparando cada mutante con la WT). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$).

III.2.2.3. Purificación de las mutantes de la GLA y posterior medición de la actividad específica

La proteína rhGLA WT y las mutantes se purificaron mediante cromatografía de afinidad gracias a la etiqueta de His-tag, como se explica en Materiales y Métodos (sección III.4.7). Las mutantes fueron purificadas y analizadas mediante SDS-PAGE (12%) (Figura III-6A). Durante la purificación se observó que algunas mutantes se purificaban mejor que otras, ya que algunas quedaron retenidas en la resina y no se pudieron eluir correctamente, sin embargo, eran las que presentaban menores niveles de expresión y/o actividad.

Luego, se procedió a medir la actividad específica de las mutantes purificadas. Se observó que todas las mutantes que se lograron purificar, mostraron una mayor actividad que la rhGLA WT (definida como 100% de actividad): la RN con 120% de actividad, la R252T con 150% de actividad y las mutantes de delección, Δ7 y Δ10 con 180% y 160% de actividad, respectivamente. Todas las mutantes presentaron diferencias estadísticamente significativas en su valor de actividad específica con respecto a la WT (Figura III-6B).

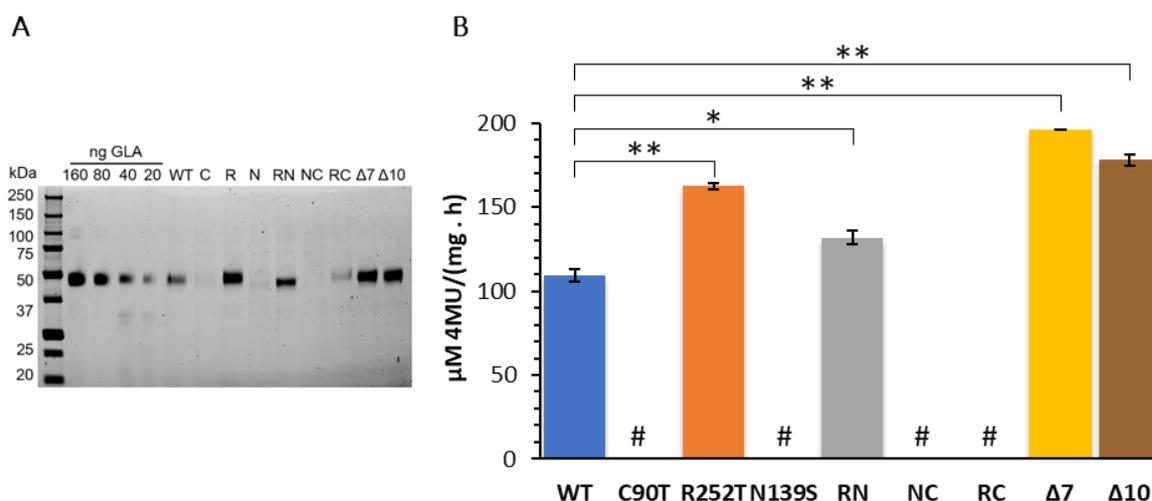


Figura III-6. Mutantes de la proteína GLA purificadas mediante cromatografía de afinidad a través del His-tag. (A) Análisis SDS-PAGE de las mutantes de la GLA purificadas. En los primeros carriles se observa una curva patrón con 4 diluciones de una proteína control GLA WT purificada. (B) Actividad específica de la rhGLA WT y de las mutantes purificadas. #: datos por debajo del límite de detección de la técnica. La actividad específica se expresó como μmol de 4-metilumbeliferona / (mg de proteína · h). Los datos correspondientes a la actividad de las mutantes de la rhGLA purificadas fueron analizados mediante T-test, comparando cada una de las proteínas mutantes con la WT. Los asteriscos indican diferencias significativas (*p<0.05, **p<0.001).

III.2.2.4. Estabilidad de las mutantes de la GLA purificadas

Luego de la purificación, se realizó un ensayo de estabilidad midiendo las actividades de la rhGLA WT y de las mutantes purificadas a los 2, 4 y 8 días post-purificación. Este ensayo se realizó con las proteínas almacenadas a 4° C en buffer Tris-HCl pH 7.4, que fue el utilizado en el proceso de purificación.

En los resultados se puede observar, en general, que las mutantes son más estables que la proteína rhGLA WT, la cual conserva menos de 1% de actividad remanente al día 8, luego de la purificación (**Figura III-7**). Las mutantes más estables son las de delección, $\Delta 7$ y $\Delta 10$ que al día 8 conservan un 83% y un 60% de actividad remanente, respectivamente (valores estadísticamente significativos con respecto a la GLA WT). Este resultado, si bien es preliminar, sugiere que las mutantes serían más activas y/o estables que la proteína WT, especialmente las mutantes de delección. Este es un resultado muy interesante y prometedor teniendo en cuenta que se realizó en un buffer que, si bien no es el óptimo para el almacenamiento de las enzimas, tiene un pH similar al de la sangre, lo cual es interesante teniendo en cuenta que la proteína se administra por infusión intravenosa.

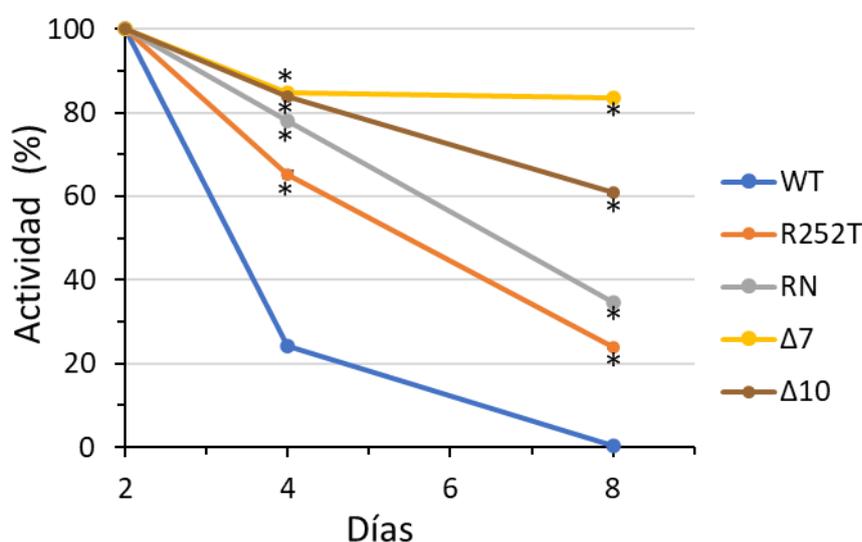


Figura III-7. Estabilidad de las mutantes de la GLA purificadas. La actividad de alfa-galactosidasa A se midió luego del almacenamiento en un buffer pH 7.4 a 4 °C. Los datos correspondientes a la actividad de las mutantes de la rhGLA purificadas fueron analizados mediante T-test, comparando cada una de las proteínas mutantes con la WT (en cada día post purificación). Los asteriscos indican diferencias significativas (* $p < 0.01$).

III.2.3. Análisis del uso potencial de etiquetas de afinidad basadas en inteínas para purificar la rhGLA expresada en células de mamífero en cultivo

Un aspecto muy importante en el proceso de producción de proteínas recombinantes es la purificación de las mismas. Teniendo en cuenta que las proteínas inyectables de uso humano no pueden contener aminoácidos extras, el uso de tags de afinidad para la purificación de las mismas es de uso limitado, ya que implica un posterior tratamiento con una proteasa para eliminar el mismo, y con ello más costos y nuevos pasos de purificación de la proteína de interés. Previamente se mencionó (Capítulo I, Discusión) que las inteínas son una alternativa potencialmente económica para ser utilizada en conjunto con etiquetas de afinidad, facilitando la posterior eliminación de las mismas durante la purificación de la proteína. En este sentido, planteamos el uso de etiquetas de

afinidad basadas en inteínas para purificar, en un solo paso cromatográfico y libre de etiqueta de afinidad, la rhGLA producida en células de mamífero en cultivo.

En principio, decidimos evaluar la expresión y el clivaje de la mini inteína DnaB fusionada al N-terminal de la proteína GLA. Si bien está reportado que las inteínas tienden a clivarse *in vivo* en células eucariotas activadas por el pH (Cooper et al., 2018), decidimos evaluarlo para esta inteína en particular.

III.2.3.1. Plásmido para la expresión en células CHO-K1 de la rhGLA con la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaB

El análisis de la mini inteína DnaB se realizó mediante la expresión de la proteína de interés GLA y la proteína control DNasa I. Para realizar las construcciones se modificaron los plásmidos utilizados anteriormente, pCIneo-GLA y pCIneo-DNasal (ver Materiales y Métodos, sección III.4.9). Las nuevas construcciones contienen la secuencia codificante del CBD (que permite la unión de la proteína de fusión a la resina de quitina), de la mini inteína DnaB en el N-terminal de las proteínas, y junto al sitio de corte de la inteína se añadió la secuencia codificante de tres aminoácidos, Ser-Gly-Ser [SGS, descrita como muy eficiente para el clivaje de esta inteína (Lu et al., 2011)] para asegurar el clivaje en esta prueba de concepto (Figura III-8).

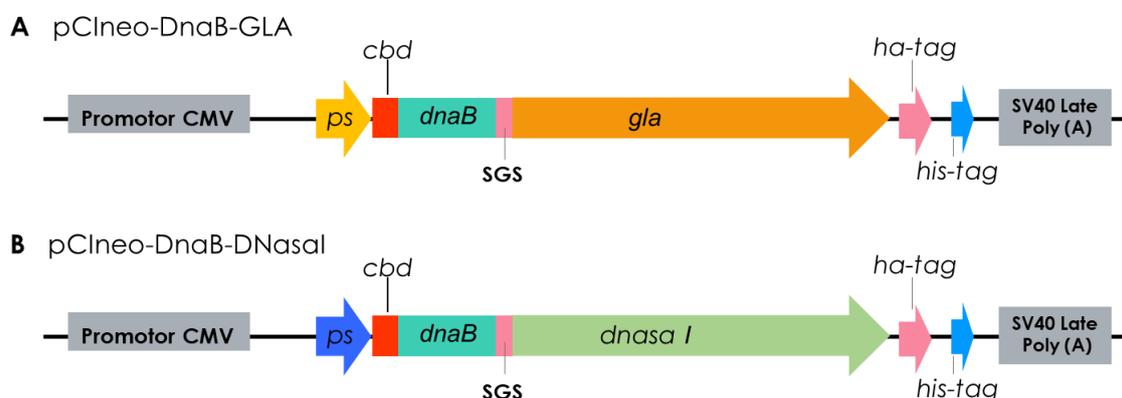


Figura III-8. Esquema representativo de las construcciones realizadas en el plásmido pCIneo para evaluar el funcionamiento de la mini inteína DnaB en las células CHO-K1. A) pCIneo-DnaB-GLA: construcción correspondiente a la proteína GLA con la mini inteína N-terminal DnaB. B) pCIneo-DnaB-DNasal: construcción correspondiente a la proteína control DNasa I con la mini inteína N-terminal DnaB. A todas las construcciones se le adicionaron luego del sitio de corte, la secuencia codificante de tres aminoácidos, SGS, para asegurar el clivaje. *ps*, en amarillo: región codificante del péptido señal de la proteína GLA humana; en azul: región codificante del péptido señal de la proteína DNasa I humana. *cbd*: región codificante del dominio de unión a quitina. *his-tag*: región codificante de la etiqueta de afinidad His-tag. *ha-tag*: región codificante de la etiqueta HA.

III.2.3.2. Expresión en células CHO-K1 de la rhGLA con la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaB

Las células CHO-K1 se transfectaron con los plásmidos mencionados anteriormente (Figura III-8). Luego de 24 hs post-transfección, las células fueron lisadas y las muestras de extracto total de proteína fueron analizadas mediante ensayo *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-HA. El procedimiento utilizado se explica en Materiales y Métodos (sección III.4.2). En los resultados no se observa la producción de la proteína rhGLA cuando su N-terminal se fusiona a la mini inteína DnaB (Figura III-9A). En el caso de la proteína control rhDNasa I, cuando está fusionada a la mini inteína DnaB, la expresión es considerablemente menor que cuando la proteína rhDNasa I se expresa sola (Figura III-9B).

Para evaluar el clivaje de la mini inteína DnaB fusionada al N-terminal de la proteína control rhDNasa I, las células previamente transfectadas se lisaron en el buffer de clivaje a un pH= 6.5 y temperatura ambiente como se explica en Materiales y Métodos (sección III.4.10). Luego de la centrifugación, los extractos totales de proteína soluble se mantuvieron en el buffer de clivaje toda la noche, para evaluar el corte de la inteína. Como el buffer utilizado para la lisis celular, generalmente, contiene inhibidor de proteasas (PIC) y la inteína posee actividad autoproteasa, que podría verse afectada por el mismo, se ensayaron condiciones en presencia y ausencia de PIC. Además de la condición mencionada anteriormente, el clivaje se evaluó a temperatura ambiente (temperatura que favorece el clivaje) y a 4 °C para evitar que las proteasas degraden nuestra proteína. Transcurrido el tiempo de incubación para el clivaje, las muestras fueron analizadas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-HA. Bajo estas condiciones experimentales no se observó el clivaje de la inteína y las proteínas permanecieron fusionadas (Figura III-9B).

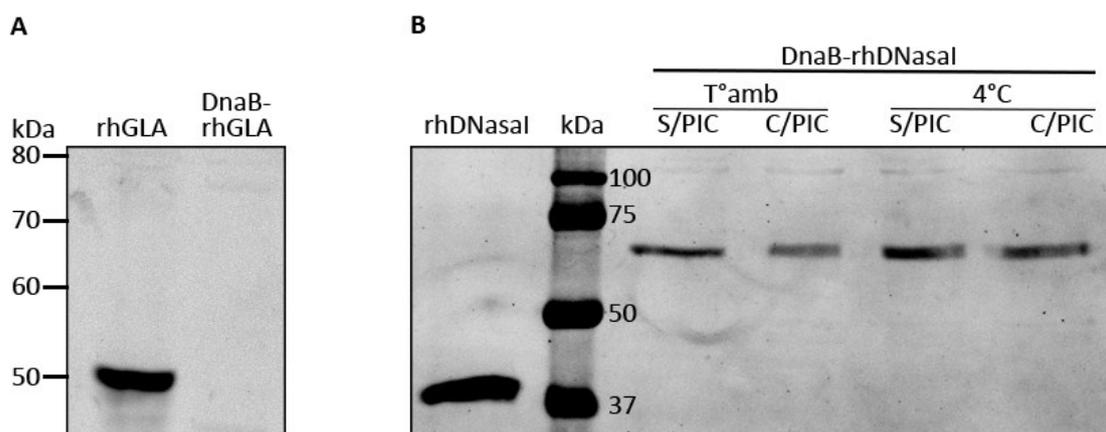


Figura III-9. Expresión de la rhGLA con la etiqueta de afinidad autoclivable N-terminal DnaB y análisis del clivaje intracelular de la misma. A) Expresión de la proteína rhGLA sola y fusionada a la mini inteína DnaB N-terminal. B) Expresión de la proteína rhDNasal sola y fusionada a la mini inteína DnaB N-terminal. En los carriles de la derecha se observan las diferentes condiciones utilizadas para evaluar el clivaje de la mini inteína DnaB intracelular, toda la noche. S/PIC: sin inhibidor de proteasas; C/PIC: con inhibidor de proteasas; T° amb: temperatura ambiente. En los dos casos, A y B, las muestras de extracto total de proteína se analizaron mediante ensayo de *Western blot* utilizando anticuerpo primario anti-HA.

III.2.3.3. Expresión en células HEK 293F de la rhGLA con las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales DnaB y DnaX

Teniendo en cuenta que la inteína DnaB N-terminal analizada en células CHO-K1 adheridas, en un caso no permitió la expresión de la proteína de fusión y en el otro caso no permitió el posterior clivaje de la proteína analizada, decidimos evaluar el posible uso de una nueva inteína, la mini inteína DnaX. En nuestro laboratorio, ya habíamos analizado en bacterias, la mini inteína DnaX fusionada en el C-terminal de una proteína de interés (ver sección I.2.3), observando que el clivaje de la misma funcionaba y que el nivel de expresión era mayor que con la mini inteína DnaB C-terminal. Por lo tanto, realizamos dos nuevas construcciones para la expresión de la proteína rhGLA, con las mini inteínas DnaX y DnaB fusionadas en el C-terminal de la proteína (Figura III-10). El diseño de las construcciones se explica en la sección III.4.11 de Materiales y Métodos.

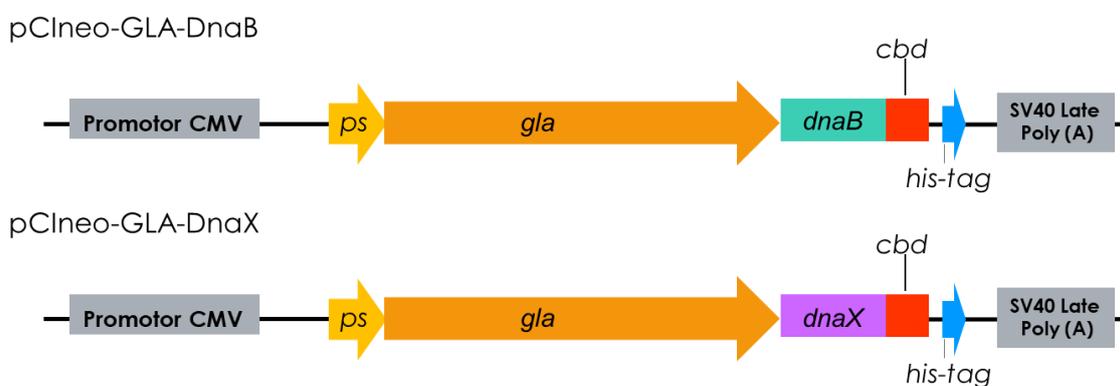


Figura III-10. Esquema representativo de las construcciones realizadas en el plásmido pCIneo para evaluar el funcionamiento de las mini inteínas C-terminales, DnaB y DnaX, en las células HEK 293F. *ps*, en amarillo: región codificante del péptido señal de la proteína GLA humana; *cbd*: región codificante del dominio de unión a quitina. *his-tag*: región codificante de la etiqueta de afinidad His-tag. Las regiones codificantes de las mini inteínas fueron optimizadas tanto para su expresión en células HEK 293F como en células CHO-K1.

Para llevar a cabo este objetivo utilizamos el sistema de expresión TGE (Corchero et al., 2011) en células HEK 293F que, como se describió anteriormente en la sección III.2.2, permite procesar simultáneamente múltiples muestras.

Luego de 6 días post-transfección se tomaron los sobrenadantes de cultivo y se procedió a evaluar la expresión y el clivaje de las proteínas fusionadas a las mini inteínas. El clivaje *in vitro* se evaluó bajo una condición de pH 6,5 y a temperatura ambiente por 24 hs y 48 hs. También, se evaluó el clivaje por 48 hs bajo esta misma condición de pH y temperatura, pero con el agregado de DTT (agente reductor) que normalmente induce el clivaje de las inteínas (Mills et al., 1998). Transcurrido el tiempo de incubación para el clivaje, las muestras fueron analizadas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-GLA (Figura III-11).

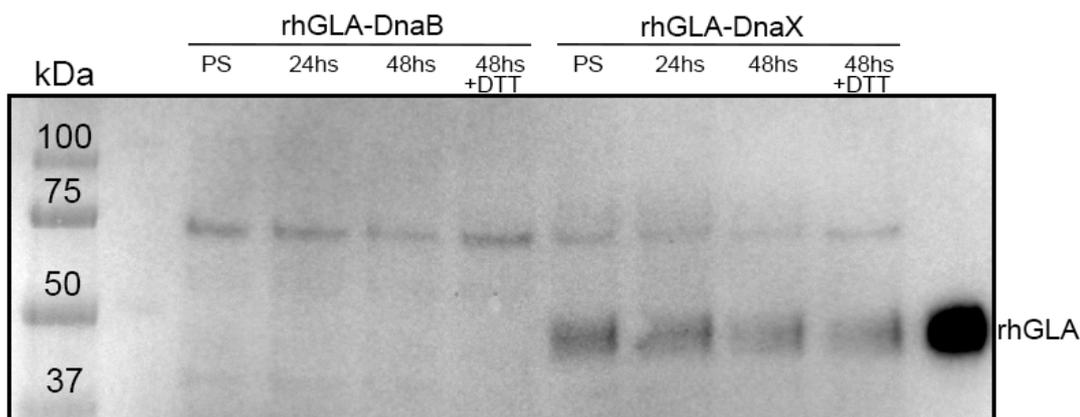


Figura III-11. Análisis de la expresión y clivaje de las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales, DnaB y DnaX, fusionadas a la proteína rhGLA. Carriles PS: proteína soluble en el sobrenadante previa al clivaje *in vitro*; carriles 24 hs: condición de clivaje de la inteína a pH 6,5 y temperatura ambiente por 24 hs; carriles 48 hs: condición de clivaje de la inteína a pH 6,5 y temperatura ambiente por 48 hs; carriles 48 hs + DTT: condición de clivaje de la inteína a pH 6,5 y temperatura ambiente más DTT 0,1M por 48 hs. En el último carril se observa una rhGLA purificada control. Luego del tiempo de incubación para el clivaje, las muestras fueron analizadas mediante *Western blot* utilizando un anticuerpo primario anti-GLA.

Como se puede observar en el ensayo de *Western blot*, la mini inteína DnaB C-terminal, no sufre clivaje *in vivo* ni *in vitro*. La mini inteína DnaX C-terminal se observa mayoritariamente clivada en la muestra de sobrenadante (PS), previa al clivaje *in vitro*, indicando que sufre un clivaje *in vivo* en una gran proporción, y su incubación con DTT, *in vitro*, no parece incrementar los niveles de clivado.

Si bien las mini inteínas analizadas hasta el presente no nos permitieron el desarrollo de una etiqueta de afinidad asociada a una inteína funcional en células de mamífero en cultivo, en la literatura existe una gran cantidad de inteínas reportadas. Teniendo en cuenta la diversidad de secuencia de las mismas, existe aún la posibilidad de que algunas sean funcionales en células de mamífero en cultivo, ya sea bajo la forma de mini o *split* inteína.

III.3. DISCUSIÓN

Las enfermedades huérfanas son enfermedades de alto impacto socio-económico debido a las dificultades existentes para ser diagnosticadas, tratadas y para el desarrollo de terapias para su tratamiento. Sumado a esto, los costos tanto para el desarrollo de las terapias como para la aplicación de las mismas, son extremadamente altos (Platt, 2018). Para la ERT de la enfermedad de Fabry sólo hay disponibles dos productos comerciales a nivel mundial (Modrego et al., 2021) y ninguno de los dos se produce en nuestro país.

Teniendo en cuenta nuestro tercer objetivo, logramos la expresión exitosa de la proteína recombinante GLA glicosilada y activa en células de mamífero en cultivo. Este resultado nos permitió sentar las bases para una potencial producción de la rhGLA como un biosimilar. Mediante el sistema de expresión transiente (TGE) en células HEK 293F en suspensión y libres de suero, pudimos obtener la proteína GLA WT purificada con un peso molecular esperado de ~50 kDa y pudimos realizar los ensayos correspondientes de actividad, corroborando que la proteína es activa. Si bien este sistema TGE nos permitió realizar los experimentos iniciales, es nuestra intención desarrollar una línea estable que exprese la proteína GLA WT en células CHO, las cuales están aprobadas para la expresión de biofarmacéuticos.

Si bien se sabe que, para aplicaciones terapéuticas, las etiquetas de afinidad deben eliminarse del producto final, fusionamos la rhGLA WT a una etiqueta de His-tag para poder seguir a la proteína y purificarla de una forma sencilla, en una etapa inicial. Resultados preliminares obtenidos en el laboratorio del Dr. Corchero mostraron que para la GLA WT la etiqueta de His-tag no afecta significativamente su actividad enzimática.

En cuanto al tratamiento de la FD, se han llevado a cabo acciones importantes para mejorarlo, pero todavía no existe una cura definitiva. Actualmente, la ERT presenta varias limitaciones (Modrego et al., 2021). Entre ellas, la dificultad para la llegada de la enzima a los diferentes tejidos afectados por la patología (como el riñón y el corazón), las reacciones asociadas a una terapia de por vida con administración intravenosa y el alto costo. Además, uno de los principales inconvenientes que presenta actualmente la ERT, es la formación de anticuerpos antidrogas (ADAs) contra la GLA recombinante. El uso de las enzimas mutadas con mayor actividad permitiría obtener el mismo (o incluso mayor) efecto terapéutico con dosis más bajas de la GLA, lo que resultaría probablemente en una formación de ADAs menor o reducida.

Con este objetivo, planteamos la búsqueda de mutantes más activas y/o con propiedades mejoradas de la proteína GLA. Para esto, se seleccionaron cinco mutantes (C90T, R252T, N139S, $\Delta 7$ y $\Delta 10$) reportadas en bibliografía como más activas, y cuyas actividades iban desde 117% hasta 460%, comparadas con la GLA WT (100% de actividad) (Lukas et al., 2013; Miyamura et al., 1996; Qiu et al., 2015). También, se diseñaron tres nuevas mutantes de la rhGLA combinando mutaciones individuales (RN, CN y RC). Todas las

proteínas mutantes se expresaron, purificaron y analizaron en el mismo sistema experimental.

La mutante C90T contiene una mutación en una cisteína libre, es decir que no forma parte de ningún puente disulfuro. Esta mutante, en la bibliografía se expresó de forma transiente en células HEK 293 adheridas y/o en células EXPI293F en suspensión, y se purificó mediante diferentes cromatografías en un buffer pH 7, reportando una actividad de 187% (Qiu et al., 2015).

Las mutantes N139S y R252T reportadas en la bibliografía, se expresaron de forma transiente por 60 hs en células HEK 293H adheridas y sus actividades se midieron en los sobrenadantes de cultivo mostrando actividades de 148% y 117%, respectivamente (Lukas et al., 2013). Cabe destacar que la mutante N139S se detectó en una paciente con algunas manifestaciones clínicas relacionadas con la enfermedad de Fabry (Havndrup et al., 2010). La discrepancia entre la mayor actividad de esta mutante y la manifestación de algunos síntomas relacionados con la FD exige una mayor caracterización de dicha mutante. Por otro lado, si bien esta mutante presenta una mutación en un sitio de glicosilación, está reportado que la eliminación individual de este sitio no afectaría negativamente el transporte o la actividad de la enzima (Ioannou et al., 1998b).

Finalmente, en la bibliografía están reportadas las mutantes con deleciones, $\Delta 7$ y $\Delta 10$ en el C-terminal de la GLA; éstas se expresaron de forma transiente por 72 hs en células COS-1 adheridas y sus actividades se midieron en los lisados celulares (Miyamura et al., 1996). Este trabajo reportó valores de actividades de 460% y 280% para las mutantes $\Delta 7$ y $\Delta 10$, respectivamente.

Los resultados obtenidos bajo nuestras condiciones experimentales, en general, muestran que los valores de actividad de las mutantes seleccionadas son menores o muestran menor diferencia con respecto a la rhGLA WT, que los valores de actividad reportados en la bibliografía. Muchas de las mutantes que expresamos tienen bajos niveles de secreción en el medio de cultivo (C90T, N139S y sus combinaciones), además muestran valores de actividad más bajos en sobrenadante y presentan dificultades a la hora de ser purificadas. Estas diferencias con respecto a las reportadas en la bibliografía, podrían atribuirse a las diferencias en los sistemas experimentales usados. Podrían deberse a las líneas celulares, condiciones de cultivo, días de sobreexpresión, métodos de colección o purificación de las proteínas, uso de la proteína secretada o intracelular para medir la actividad, condición de almacenamiento de las proteínas, así como el tiempo transcurrido desde la purificación o colección de las células o sobrenadantes hasta la medición de la actividad.

Basándonos en nuestros resultados, está claro que los valores obtenidos en la medición de la actividad específica están muy influenciados por la condición de almacenamiento de la proteína y por el tiempo que la misma permanece almacenada hasta que se realiza la medición de la actividad. Bajo nuestras condiciones experimentales,

mientras más tiempo transcurre entre la purificación y la medición de la actividad, mayores diferencias se observan entre los valores de actividad de las mutantes y los valores de actividad enzimática de la GLA WT.

Otro factor a considerar, para explicar las diferencias antes mencionadas entre los resultados reportados en la bibliografía y los nuestros, es la presencia de la etiqueta His-tag en nuestras mutantes. Si bien se adicionó esta etiqueta de afinidad para poder purificar las mutantes de una forma sencilla en una etapa inicial, está claro que esta etiqueta debe ser removida y deberemos corroborar los resultados de actividad sin ella. Teniendo en cuenta las diferencias entre los valores de actividad enzimática reportados para las mutantes en la bibliografía y los nuestros, una posibilidad es que la presencia del His-tag pueda afectar el plegamiento de nuestras proteínas, afectando la actividad de las mismas, los niveles de secreción y el proceso de purificación.

En lo que a estabilidad se refiere, los experimentos correspondientes a la medición de la actividad de las mutantes purificadas (R252T, RN, $\Delta 7$ y $\Delta 10$) a través del tiempo, mostraron que las mutantes presentan una mayor estabilidad que la proteína GLA WT. Como se mencionó anteriormente, las mutantes más estables son las de delección, $\Delta 7$ y $\Delta 10$, las cuales conservan un alto porcentaje de actividad al día 8, 83% y 60%, respectivamente, mientras que la proteína WT conserva menos de un 1% de actividad.

Este resultado sugiere que las mutantes más estables que la proteína rhGLA, permitirían implementar nuevas estrategias como alternativa a las terapias existentes para la enfermedad de Fabry. Si bien es necesario confirmar estos resultados con las mutantes sin etiqueta de afinidad, creemos que es un resultado muy prometedor ya que podría solucionar los problemas de administración frecuente de la enzima, las altas dosis utilizadas y los anticuerpos que se generan con la administración. En este sentido continuamos trabajando en colaboración con el Dr. José Luis Corchero para analizar estas mutantes sin etiqueta de afinidad y purificarlas mediante diferentes métodos cromatográficos. Además, es nuestra intención analizar las mutantes más prometedoras en ratones deficientes en la enzima GLA o células de los mismos en cultivo. Estos estudios serán realizados en colaboración con el grupo de la Dra. Abasolo que actualmente también colabora con el Dr. Corchero (Seras-Franzoso et al., 2021). Además, hemos diseñado construcciones con combinaciones de las mutantes más prometedoras para evaluar si se potencia la actividad y/o estabilidad de las mismas, como así también derivados de las mismas sin el His-tag, para evaluar su efecto.

Finalmente, la etapa de purificación también es un aspecto importante en la producción de una proteína terapéutica, y con el objeto de contribuir a mejorar este proceso es que tratamos de implementar sistemas de purificación con etiquetas de afinidad basadas en inteínas.

Estos sistemas permiten tanto la purificación de la proteína de interés mediante cromatografía de afinidad, a la vez que permiten el clivaje de la etiqueta en un solo paso,

liberando la proteína de interés sin etiquetas ni aminoácidos extras. Cabe recordar que en el presente trabajo (Resultados del Capítulo I), diseñamos e implementamos exitosamente una nueva etiqueta de afinidad, basada en una inteína, utilizando como proteína modelo a la rhGH, para su uso en bacterias.

Basándonos en estos resultados, diseñamos constructos para poder implementar este sistema de purificación en células de mamífero en cultivo. En estos experimentos se probaron las mini inteínas DnaB (N- y C-terminal) y DnaX (C-terminal). Los resultados mostraron que cuando se fusiona la mini inteína DnaB en el N-terminal de la proteína de interés, la proteína de fusión no se expresa o se expresa muy poco y en este último caso, cuando se analiza el clivaje *in vitro*, no se autocliva. Por otro lado, cuando probamos las mini inteínas en el C-terminal de la proteína de interés, la DnaX se expresa y se cliva mayoritariamente *in vivo* y la DnaB se expresa, pero no sufre clivaje, ni *in vivo* ni *in vitro*.

Una posible explicación de por qué la inteína DnaB fusionada a una proteína de interés no se expresa, se expresa muy poco o no se cliva, podría ser que sufra alguna modificación postraducciona (MPT) que la afecte. Mediante un análisis en la base de datos PROSITE (<http://www.expasy.org/prosite/>) de la secuencia de esta inteína, observamos que existen posibles sitios de MPT, lo cual sería un aspecto a tener en consideración.

Cuando las inteínas se fusionaron en el C-terminal de la proteína de interés, la expresión mejora, pero no observamos clivaje con la inteína DnaB y, por el contrario, la inteína DnaX se cliva mayoritariamente *in vivo*. Si bien está reportado el clivaje *in vivo* de algunas inteínas en sistemas eucariotas (Cooper et al., 2018), existen muchas inteínas con secuencias diferentes que potencialmente podrían evitar el clivaje espontáneo *in vivo*. Además, también están reportadas diversas estrategias que podrían solucionar este problema con el mismo objetivo, como utilizar *split* inteínas para evitar el clivaje *in vivo*, o utilizar inteínas que activen su clivaje en determinada concentración salina (Aranko & Iwaï, 2021; Liu et al., 2020). Considerando que la inteína DnaX, evaluada en nuestro sistema de purificación en bacterias, sufría un porcentaje de clivaje *in vivo* (ver sección 1.3) que luego disminuyó al cambiar el pH del medio de cultivo a uno mayor a 6.5, creemos que una posible explicación del clivaje espontáneo de la DnaX *in vivo* en células de mamífero, podría deberse al pH del medio de cultivo. Este sería un aspecto a evaluar, tratando de crecer las células de mamífero en medios de cultivos a valores de pH más alcalinos.

El clivaje *in vivo* de la mini inteína DnaX, pone en evidencia su funcionalidad y que tiene el potencial de clivarse en las condiciones adecuadas. Esto significa que la mini inteína DnaX permitiría probar una nueva estrategia de clivaje utilizando una versión *split* de la misma. Recordemos que para crear una *split* inteína, se divide a la mini inteína en dos dominios, uno N- y otro C-terminal. Estos dominios se obtienen como dos polipéptidos separados (uno de los cuales estará unido a la proteína de interés). Luego de la expresión de la proteína de interés, estos dos fragmentos se vuelven a ensamblar en una sola estructura que funciona de manera similar a una inteína completa, activando el clivaje *in vitro* y evitando el clivaje *in vivo*.

III.4. MATERIALES Y MÉTODOS

III.4.1. Construcción de los plásmidos para la expresión de la GLA WT

La proteína rhGLA WT se expresó a partir del plásmido pCIneo-GLA. Este vector de expresión contiene la secuencia codificante de la GLA humana y su péptido señal. También se diseñó un plásmido, pCIneo-GLA* conteniendo la secuencia codificante de la GLA humana con el péptido señal de la GLA nativa de células CHO. En el C-terminal de cada secuencia codificante, se adicionó una secuencia de unión (*linker*) GGGGS junto a una etiqueta HA (HA-tag) y luego el *linker* ANDGL junto con la etiqueta de 6 histidinas. Estos *linkers* se obtuvieron de las secuencias publicadas de plásmidos comerciales. Las secuencias codificantes de las proteínas (con sus respectivos péptidos señales) y de las etiquetas fueron sintetizadas comercialmente (GenScript, <https://www.genscript.com/>) y clonadas entre los sitios de restricción XhoI y XbaI en el vector de expresión pCIneo (Promega Corp.; Madison, WI, EE. UU.). En el caso de la construcción pCIneo-GLA*, el uso de codones fue optimizado para la expresión en células CHO. En estas construcciones la producción de las proteínas está bajo el control del promotor CMV. El plásmido de expresión pCIneo-DNasal se utilizó como control en los experimentos indicados.

Tanto para el vector de expresión de la rhGLA como para el vector de expresión control de la rhDNasa I, se generaron sitios de restricción en el N- y C-terminal de las construcciones para poder realizar los cambios que se necesitaran como adicionar o quitar elementos como etiquetas de afinidad, proteínas de fusión, inteínas, etc. En la **Figura III-11** se esquematiza el diseño que se realizó para la proteína rhGLA.

Vector de expresión pCI-neo

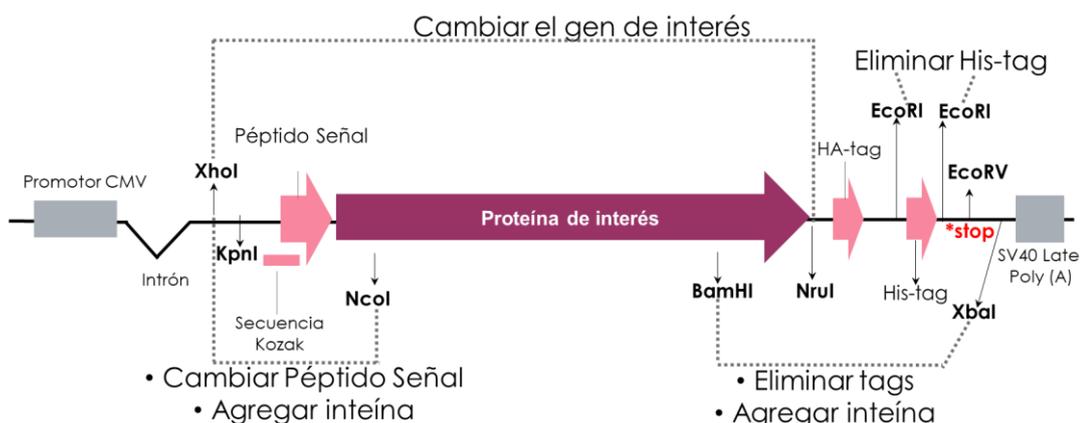


Figura III-12. Plásmido de expresión pCIneo para la expresión de la proteína rhGLA con los sitios de restricción que se generaron para poder realizar cambios a futuro.

Los vectores fueron purificados desde los correspondientes cultivos DH5 α crecidos durante toda la noche, utilizando Presto Mini Plasmid Kit (Geneaid). Para su cuantificación se midieron las absorbancias a 260 nm (A₂₆₀) y 280 nm (A₂₈₀). Para realizar las

transfecciones sólo se utilizaron los preparados con una proporción A260/A280 superior a 1,8.

III.4.2. Expresión de proteínas en células CHO-K1 adheridas

Las células CHO-K1 (A.T.C.C., Manassas, VA, EE. UU.) se cultivaron en medio Dulbecco's modified Eagle's médium (DMEM) (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.) conteniendo suero fetal bovino al 10 % (v/v) y antibióticos, y se mantuvieron a 37 °C y 5% de CO₂, en una incubadora humidificada. Las transfecciones transientes con los vectores mencionados anteriormente, se realizaron utilizando polietilenimina (PEI) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) en un medio libre de suero con 1 µg del plásmido, indicado por placa de 35 mm de diámetro, durante 2.5 hs a 37 °C. Las células se analizaron 24 h después de la transfección.

Para la detección de las proteínas por inmunofluorescencia, las células previamente transfectadas y cultivadas en un cubreobjetos de vidrio se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 1% (p/v). Luego se permeabilizaron con saponina al 0,1 % (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE. UU.) y se lavaron e incubaron durante toda la noche a 4 °C con el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.). Finalmente, las células se lavaron y se incubaron durante 2 h a 37 °C con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a Alexa Fluor 488 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Los núcleos se tiñeron de azul con colorante Hoechst 33258 (Molecular Probes, Eugene, OR, EE. UU.). Las imágenes confocales se recopilaron utilizando un Olympus FluoView microscopio confocal FV1200 (Tokio, Japón).

Para el análisis de la GLA intracelular, las células se lavaron, colectaron y lisaron con buffer de lisis (Tris 20mM, EDTA 1mM, TX100 1%, NaCl 150mM, Glicina 10mM, mezcla de inhibidores de proteasas) durante una hora a 4°C. El lisado se clarificó por centrifugación y se analizó mediante SDS-PAGE (12%) seguido de *Western blot* utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), y como anticuerpo secundario el anti-IgG de ratón acoplado a IRDye800CW (LI-COR Biotechnology). Los pesos moleculares se calcularon en base a estándares calibrados (Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; Life Technologies) corridos en cada gel. Las bandas de proteínas se detectaron utilizando el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, UK).

III.4.3. Ensayo con tunicamicina

Se realizó una transfección transiente de las células CHO-K1 con el plásmido pCIneo-GLA y el plásmido control pCIneo-DNasa. Luego de 2.5 hs se retiró la mezcla de la transfección y se añadió medio de cultivo nuevo con suero fetal bovino al 10% (células

control) o medio nuevo con suero fetal bovino al 10% más 10 µg/mL de tunicamicina (células tratadas con tunicamicina). Los cultivos se continuaron durante 14 hs y luego las células se lisaron y analizaron mediante ensayo *Western blot* como se mencionó anteriormente (sección III.4.2).

III.4.4. Construcción de los plásmidos para la expresión de las mutantes de la rhGLA

Para expresar la proteína rhGLA WT en células HEK 293F, se realizó una construcción mediante la modificación del plásmido utilizado anteriormente pCIneo-GLA, donde la etiqueta HA y su *linker* fueron eliminados, y antes de la etiqueta His-tag se reemplazó la secuencia *linker* con una lisina (K), basándonos en el diseño realizado por Corchero et al. (Corchero et al., 2011). Este nuevo plásmido recibió el nombre pCIneo-GLAKWT. Para las construcciones de las mutantes se utilizó el plásmido pCIneo-GLAKWT, el cual fue mutado como se explica en la Tabla III-1. Las mutaciones y los cambios mencionados anteriormente fueron realizados por GenScript (<https://www.genscript.com/>).

Las versiones mutantes del gen de la proteína rhGLA se generaron por delección o mutación puntual del plásmido pCIneo-GLAKWT (GenScript) y se describen en la Tabla III-1.

Tabla III-1

Mutaciones realizadas en la proteína rhGLA WT.

Mutaciones puntuales con sustitución de un solo aminoácido	pCIneo-GLAK C90T: sustitución de cisteína por treonina en la posición 90 (C90T)
	pCIneo-GLAK N139S: sustitución de asparagina por serina en la posición 139 (N139S)
	pCIneo-GLAK R252T: sustitución de arginina por treonina en la posición 90 (R252T)
Combinación de mutaciones puntuales	pCIneo-GLAK CN: C90T más N139S
	pCIneo-GLAK CR: C90T más R252T
	pCIneo-GLAK NR: N139S más R252T
Delecciones en el C-terminal	pCIneo-GLAK Δ7: delección de 7 aminoácidos en el extremo C-terminal
	pCIneo-GLAK Δ10: delección de 10 aminoácidos en el extremo C-terminal

Los vectores fueron purificados desde los correspondientes cultivos DH5α crecidos durante toda la noche, utilizando NZY Miniprep Kit (NzyTech #MB010). Para su cuantificación se midieron las absorbancias a 260 nm (A260) y 280 nm (A280). Para realizar las transfecciones sólo se utilizaron los preparados con una proporción A260/A280 superior a 1,8.

III.4.5. Expresión de las mutantes de la proteína rhGLA en células HEK 293F

La línea celular FreeStyle™ HEK 293F deriva de la línea celular 293, una línea permanente establecida de HEK, transformada con ADN tipo 5 de adenovirus humano cortado. Esta línea celular se creció en el medio de cultivo libre de suero FreeStyle™ 293 Expression Medium (Gibco, Invitrogen) y se mantuvo a 37° C en un agitador orbital a 120 rpm y 8% CO₂. Los pasajes celulares se realizaron cada 2-3 días a una densidad de siembra de 5 x 10⁵ células/mL. Previo a la transfección (24 hs), las células se sembraron a una concentración de 5 x 10⁵ células/mL en un frasco para agitación de 125 mL conteniendo el medio de cultivo. En el momento de la transfección, se comprobó que las células estuvieran en una concentración de ~10⁶ células/mL. Para las transfecciones, ADN (1 µg por millón de células) y PEI (3 µg cada 1 µg de ADN) se mezclaron en 200 µL del medio FreeStyle™ 293 sin suero, mediante agitación con vórtex y posteriormente se incubaron durante 10 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, las mezclas se agregaron gota a gota en los frascos correspondientes para cada transfección y se incubaron en las condiciones antes mencionadas. A las 4 hs post-transfección se agregó ácido valproico (cat. # 676380, Sigma-Aldrich) a una concentración de 4 mM.

Luego de 6 días post-transfección se centrifugaron los cultivos (10 min a 14.000 rpm) y se obtuvieron los sobrenadantes clarificados los cuales fueron analizados mediante SDS-PAGE (12%) seguido de *Western blot*. Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo policlonal de conejo anti-GLA (cat. # HPA000237, Sigma-Aldrich), y como anticuerpo secundario el anti-IgG de conejo (Ref: 170-6515, antiIgGHRP, Bio-Rad). Las cantidades de proteína recombinante se estimaron por comparación con cantidades conocidas (normalmente entre 20 y 160 ng) de una proteína GLA recombinante previamente producida, purificada y cuantificada en el laboratorio del Dr. Corchero para ser utilizada como control positivo. Los pesos moleculares se calcularon en base a estándares calibrados corridos en cada gel (Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards, cat #1610373, Bio-Rad). Para comprar cuantitativamente las muestras se corrieron en el mismo gel y se procesaron como un conjunto. Se realizaron análisis densitométricos de las bandas con el software Image Lab (Bio-Rad).

III.4.6. Ensayo enzimático para medir la actividad de la proteína GLA WT y mutantes

La alfa-galactosidasa A y las mutantes seleccionadas se analizaron fluorométricamente como describe Desnick et al. (Desnick et al., 1973) con las modificaciones de Mayes et al. (Mayes et al., 1981). La actividad se midió en los sobrenadantes clarificados y en las soluciones de proteínas purificadas en buffer Tris-HCl pH 7,4, utilizando el sustrato 4-metilumbeliferil- α -D-galactopiranosido (Sigma-Aldrich, Europa). Una alícuota de 25 µL de las soluciones de proteína, se incubó durante 60 min con agitación a 37 °C con 100 µL de sustrato preparado a una concentración 2,46 mM en buffer acético / acetato 0,01 M, pH 4,5. Las reacciones se detuvieron añadiendo 1,25 mL de un buffer de

glicina / NaOH 0,2 M, pH 10,4 y se determinó la fluorescencia en un fluorómetro (excitación 365nm/emisión 450nm). Se realizó una recta patrón con el producto, 4-metilumbeliferona (4MU) (Sigma- Aldrich) desde 0 a 500 ng/mL, en el buffer glicina previamente descrito y se leyó en las mismas condiciones que las muestras. La actividad específica se expresó en μmol de 4MU / (mg de proteína · h).

III.4.7. Purificación de las mutantes de la proteína rhGLA

Para realizar la purificación de la rhGLA WT y de las mutantes, los sobrenadantes de los cultivos luego de 6 días post-transfección, se clarificaron por centrifugación (10 min a 14.000 rpm). Luego, los sobrenadantes clarificados fueron dializados contra un buffer de equilibrado (Tris-HCl 20 mM pH 7,4, NaCl 500 mM). Las muestras dializadas se incubaron por 60 min con la resina Ni-NTA Agarose (Cat No./ID: 30210, Qiagen). Luego de la incubación se realizaron lavados de la resina con el buffer de equilibrado conteniendo imidazol 40 mM y posteriormente 80 mM. Finalmente, se eluyeron las proteínas de la resina con el buffer de equilibrado conteniendo imidazol 400 mM.

III.4.8. Estabilidad de las mutantes de la proteína GLA purificadas

Las proteínas purificadas en buffer Tris-HCl 20 mM pH 7.4, NaCl 500 mM, imidazol 400 mM, se almacenaron a 4 °C. La actividad enzimática fue determinada al día 2, 4 y 8 luego de la purificación. Para esto se siguió el procedimiento descrito en la sección III.4.6.

III.4.9. Construcción de los plásmidos para la expresión de la etiqueta de afinidad autoclivable DnaB N-terminal en células CHO-K1

Para expresar la proteína rhGLA WT junto con la mini inteína DnaB se utilizó el plásmido mencionado anteriormente, pCIneo-GLA. A este plásmido se le adicionó un fragmento de ADN sintético (GenScript, <https://www.genscript.com/>) conteniendo la región codificante del CBD a continuación de la mini inteína DnaB y junto al sitio de corte de la inteína se añadió la secuencia codificante de tres aminoácidos, Ser-Gly-Ser. Este fragmento de ADN sintético se clonó entre los sitios de restricción KpnI-NcoI, los cuales se habían generado anteriormente en el plásmido original para realizar cambios en el N-terminal de la construcción (**Figura III-11**). Para el caso de la proteína control DNasa I se utilizó la misma estrategia, pero en el plásmido pCIneo-DNasa I, entre los sitios de restricción EcoRI-BglII. Estos sitios fueron generados anteriormente en el plásmido original para realizar cambios en el N-terminal de la construcción.

El uso de codones de todos los segmentos sintéticos, excepto las partes correspondientes a las secuencias de las proteínas de interés, fueron optimizados para la expresión en células CHO-K1.

Los vectores fueron purificados y cuantificados como se mencionó anteriormente (sección III.4.1).

III.4.10. Ensayo de clivaje para la mini inteína DnaB intracelular

Para el análisis del clivaje de la mini inteína DnaB intracelular fusionada a la proteína control rhDNasa I, las células CHO-K1 previamente transfectadas, se lavaron y colectaron. Luego se lisaron a 4 °C con una jeringa tuberculina, en un buffer de clivaje (Tris-HCl 20 mM, pH 6.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM). El lisado se realizó en dos condiciones diferentes, una en presencia de inhibidor de proteasas (PIC) en el buffer y otra en ausencia del mismo. El lisado se clarificó por centrifugación y los sobrenadantes conteniendo proteína soluble, se incubaron toda la noche en dos condiciones, a temperatura ambiente y a 4 °C. Luego de la incubación, las muestras de extracto de proteína soluble se analizaron mediante SDS-PAGE (12%) seguido de *Western blot* utilizando como anticuerpo primario el anticuerpo monoclonal de ratón anti-HA (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EE.UU.), y como anticuerpo secundario el anti-IgG de ratón acoplado a IRDye800CW (LI-COR Biotechnology). Los pesos moleculares se calcularon en base a estándares calibrados (Precision Plus Protein Dual Color Standards; Bio-Rad) corridos en cada gel. Las bandas de proteínas se detectaron utilizando el equipo Odyssey Infrared Imager (LI-COR Biosciences, UK).

III.4.11. Construcción de los plásmidos para la expresión de las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales

Para expresar la proteína rhGLA WT junto con las mini inteínas C-terminales, DnaB y DnaX, se utilizó el plásmido mencionado anteriormente, pCneo-GLA. A este plásmido se le adicionaron los fragmentos de ADN sintéticos (GenScript, <https://www.genscript.com/>) correspondientes a la región codificante de las mini inteínas DnaB o DnaX junto con el CBD y la secuencia codificante de la etiqueta His-tag precedida por el *linker* GAGPTG. Los nuevos plásmidos generados de forma sintética (GenScript, <https://www.genscript.com/>) contenían las secuencias de las inteínas DnaB y DnaX optimizadas para su expresión en células CHO-K1 y HEK 293F.

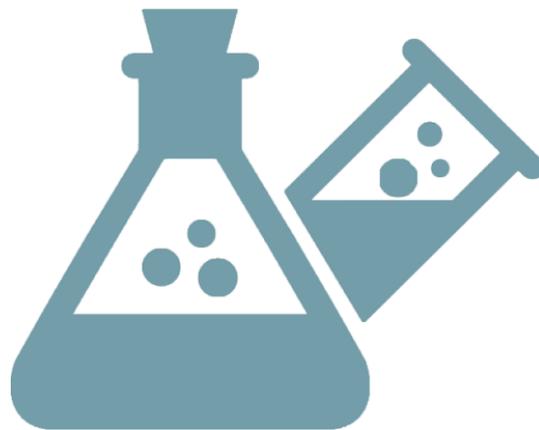
Los vectores fueron purificados y cuantificados como se mencionó anteriormente (sección III.4.1).

III.4.12. Ensayo de clivaje para las etiquetas de afinidad autoclivables C-terminales, DnaB y DnaX, provenientes de los sobrenadantes de células HEK 293F

Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo luego de 6 días post-transfección y los mismos se clarificaron mediante centrifugación (5 min a 3900 g). Para cada muestra (DnaB y DnaX), se guardaron alícuotas de los sobrenadantes clarificados para obtener las muestras

previas al clivaje *in vitro*. El resto de los sobrenadantes se dializaron en buffer de clivaje (Tris-HCl 20 mM, pH 6.5, NaCl 500 mM, EDTA 1 mM) por 24hs a temperatura ambiente. Luego se guardaron alícuotas para preparar las muestras correspondientes al clivaje de 24 hs *in vitro*. Para el resto de las muestras, la mitad se mantuvo 24 hs más en el mismo buffer de clivaje a temperatura ambiente y a la otra mitad se le adicionó DTT 0.1 M y se mantuvo por 24 hs más a temperatura ambiente.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS



CONCLUSIONES FINALES CAPÍTULO I

- Se desarrolló un sistema que combina la expresión de una proteína de interés en el espacio periplásmico de *E. coli* y su purificación, libre de aminoácidos extras, a través de una nueva etiqueta de afinidad autoclivable basada en la mini inteína DnaX.
- La optimización de las condiciones de cultivo (tris-HCl pH=8), permitió incrementar los niveles de expresión de la proteína recombinante en el espacio periplásmico de *E. coli*, con un reducido porcentaje de clivaje *in vivo* de la etiqueta de afinidad autoclivable.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Implementar el sistema de expresión y purificación, basado en la nueva etiqueta de afinidad autoclivable, para la producción otras proteínas de interés industrial en *E. coli*. En este sentido, iniciamos una colaboración para la expresión de antígenos con potencial uso en un kit diagnóstico y una vacuna de aplicación animal contra el parásito *Fasciola hepatica* (Dra. Laura Cervi- CIBICI).

CONCLUSIONES FINALES CAPÍTULO II

- Se desarrolló e implementó el escalado de la producción de proteínas recombinantes de uso industrial en *E. coli*, mediante un cultivo *fed-batch* de alta densidad en biorreactor, usando la rLOX como proteína modelo y de interés.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Adaptar el proceso de cultivo *fed-batch* de alta densidad desarrollado con la enzima rLOX para la producción de nuevas proteínas de interés industrial [glicerol fosfato oxidasa (GPO), glicerol kinasa (GK), colesterol oxidasa (ChO)].

CONCLUSIONES FINALES CAPÍTULO III

- Se logró la expresión de la proteína rhGLA en células de mamífero en cultivo, sentando las bases para una posible producción de la rhGLA como un biosimilar
- Se implementó un sistema de expresión transiente (TGE) de alta eficiencia en células HEK 293F en suspensión para la producción de la proteína rhGLA WT y sus mutantes de interés.
- Se caracterizaron mutantes de la rhGLA más activas/estables que potencialmente podrían ser más efectivas en el tratamiento de la enfermedad de Fabry.

PERSPECTIVAS A FUTURO

- Realizar estudios *in vivo* de la eficacia de las mutantes de la rhGLA más activas/estables en células/ratones deficientes en la misma.
- Implementar en nuestro Instituto el sistema de alta eficiencia de transfección transiente (TGE) en células de mamífero en cultivo para la expresión de proteínas recombinantes de interés.
- Desarrollar un sistema de purificación para proteínas recombinantes expresadas en células de mamífero en cultivo, libres de aminoácidos extras, utilizando una etiqueta de afinidad basada en la *split* inteína DnaX.

Como parte de este trabajo de Tesis se publicaron los siguientes artículos de investigación:

- **Amaranto, M., Vaccarello, P., Correa, E. M. E., Barra, J. L., & Godino, A. (2021). Novel intein-based self-cleaving affinity tag for recombinant protein production in *Escherichia coli*.** Journal of Biotechnology, 332(January), 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2021.04.003>
- Modrego, A., **Amaranto, M.**, Godino, A., Mendoza, R., Barra, J. L., & Corchero, J. L. (2021). **Molecular Sciences Human α -Galactosidase A Mutants: Priceless Tools to Develop Novel Therapies for Fabry Disease.** <https://doi.org/10.3390/ijms22126518>

Y se encuentra en consideración el siguiente manuscrito:

- **His-tagged lactate oxidase production for industrial applications using *fed-batch* fermentation.** Agustina Godino, **Marilla Amaranto**, Agustina Manassero, Fausto Comba, Martín Alonzo Pérez, Lucio Simonella, Martín Pernigotti, José Luis Barra.

BIBLIOGRAFÍA

- Aramvash, A., Sabet, A., Mansurpur, M., Azizi, A., Bahrami, A., & Kamali, N. (2018). Comparison of Purification Processes for Recombinant Human Growth Hormone Produced in *E. coli*. *Iranian Journal of Science and Technology, Transaction A: Science*, 42(4), 1697–1705. <https://doi.org/10.1007/s40995-017-0414-7>
- Aranko, A. S., & Iwai, H. (2021). The inducible intein-mediated self-cleaving tag (list) system: A novel purification and amidation system for peptides and proteins. In *Molecules* (Vol. 26, Issue 19). <https://doi.org/10.3390/molecules26195948>
- Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., & Pedersen, J. (2006). Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification*, 48(1), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.12.002>
- Babaeipour, V., Shojaosadati, S. A., & Maghsoudi, N. (2013). Maximizing production of human interferon- γ in HCDC of recombinant *E. coli*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 12(3), 563–572. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2013.1134>
- Bell, M. R., Engleka, M. J., Malik, A., & Strickler, J. E. (2013). To fuse or not to fuse: What is your purpose? *Protein Science*, 22(11), 1466–1477. <https://doi.org/10.1002/pro.2356>
- Berkmen, M. (2012). Production of disulfide-bonded proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 82(1), 240–251. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2011.10.009>
- Bishop, D. F., Kornreich, R., & Desnick, R. J. (1988). Structural organization of the human α -galactosidase A gene: Further evidence for the absence of a 3' untranslated region (Fabry disease/intron-exon junctions/full-length cDNA/promoter/lysosomal hydrolase). In *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (Vol. 85). <https://www.pnas.org>
- Burnett, M. J., Burnett, A. C., & Angela Burnett, C. C. (2020). *Therapeutic recombinant protein production in plants: Challenges and opportunities Societal Impact Statement CRISPR/Cas9, genetic engineering, plant expression systems, protein, recombinant, therapeutic*. 2, 121–132. <https://doi.org/10.1002/ppp3.10073>
- Chen, Z., Zhao, L., Ru, J., Yu, S., Yu, H., Ren, H., Zhang, Y., Zhang, W., Lin, F., & Huo, Y. X. (2019). A novel protein purification strategy mediated by the combination of CipA and Ssp DnaB intein. *Journal of Biotechnology*, 301(May), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2019.06.002>
- Cheriyen, M., Pedamallu, C. S., Tori, K., & Perler, F. (2013). Faster protein splicing with the nostoc punctiforme DnaE intein using non-native extein residues. *Journal of Biological Chemistry*, 288(9), 6202–6211. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.433094>
- Coolbaugh, M. J., Shakalli Tang, M. J., & Wood, D. W. (2017). High-throughput purification of recombinant proteins using self-cleaving intein tags. *Analytical Biochemistry*, 516, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2016.10.016>
- Cooper, M. A., Taris, J. E., Shi, C., & Wood, D. W. (2018). A Convenient Split-Intein Tag Method for the Purification of Tagless Target Proteins. *Current Protocols in Protein Science*, 91(1), 5.29.1–5.29.23. <https://doi.org/10.1002/cpps.46>
- Corchero, L., Mendoza, R., Lorenzo, J., Domí, C., Rodri, V., Ferrer-miralles, N., & Villaverde, A. (2011). *Integrated Approach to Produce a Recombinant , His-Tagged Human α -Galactosidase A in Mammalian Cells*. <https://doi.org/10.1002/btpr.637>
- Desai, P. N., Shrivastava, N., & Padh, H. (2010). Production of heterologous proteins in plants:

- Strategies for optimal expression. *Biotechnology Advances*, 28(4), 427–435. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.01.005>
- Desnick, R. J., Allen, K. Y., Desnick, S. J., Raman, M. K., Bernlohr, R. W., & Krivit, W. (1973). Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes. Alpha-galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 81(2), 157–171.
- Deutscher, J., Aké, F. M. D., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., & Joyet, P. (2014). The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 78(2), 231–256. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-14>
- Dos Reis, C., Teixo, R., Mendes, F., & Santos, R. (2016). Biosimilar medicines – Review. *International Journal of Risk & Safety in Medicine*, 28, 45–60. <https://doi.org/10.3233/JRS-160672>
- Elleuche, S., & Pöggeler, S. (2010). Inteins, valuable genetic elements in molecular biology and biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(2), 479–489. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2628-x>
- Gaciarz, A., Khatri, N. K., Velez-Suberbie, M. L., Saaranen, M. J., Uchida, Y., Keshavarz-Moore, E., & Ruddock, L. W. (2017). Efficient soluble expression of disulfide bonded proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli* in fed-batch fermentations on chemically defined minimal media. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 108. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0721-x>
- García Fernández, J. M., & Ortiz Mellet, C. (2019). Novel therapies for orphan diseases. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 10(7), 1020–1023. <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.9b00242>
- Garman, S. C., & Garboczi, D. N. (2004). The Molecular Defect Leading to Fabry Disease: Structure of Human α -Galactosidase. *Journal of Molecular Biology*, 337(2), 319–335. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2004.01.035>
- Germain, D. P. (2010). Fabry disease. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-5-30>
- Ghasemi, F., Zomorodipour, A., Shojai, S., Ataei, F., Khodabandeh, M., & Sanati, M. H. (2004). Using L-arabinose for production of human growth hormone in *Escherichia coli*, studying the processing of gIII::hGH precursor. *IRANIAN JOURNAL of BIOTECHNOLOGY*, 2(4), 250–260. http://ijbiotech.com/article_6917_93dbf27e4fa9886a7e8f7d2bdf40735c.pdf
- Guan, D., Ramirez, M., & Chen, Z. (2013). Split intein mediated ultra-rapid purification of tagless protein (SIRP). *Biotechnology and Bioengineering*, 110(9), 2471–2481. <https://doi.org/10.1002/bit.24913>
- Havndrup, O., Christiansen, M., Stoevring, B., Jensen, M., Hoffman-Bang, J., Andersen, P. S., Hasholt, L., Nørremølle, A., Feldt-Rasmussen, U., Køber, L., & Bundgaard, H. (2010). Fabry disease mimicking hypertrophic cardiomyopathy: genetic screening needed for establishing the diagnosis in women. *European Journal of Heart Failure*, 12(6), 535–540. <https://doi.org/10.1093/eurjhf/hfq073>
- Honavar, S. G. (2021). From Biologics to Biosimilars and Biobetters - Democratization of High-end Therapeutics. In *Indian journal of ophthalmology* (Vol. 69, Issue 2, pp. 207–208). https://doi.org/10.4103/ijo.IJO_150_21
- Ioannou, Y. A., Zeidner, K. M., Grace, M. E., & Desnick, R. J. (1998a). Human α -galactosidase A :

- glycosylation site 3 is essential for enzyme solubility. In *Biochem. J* (Vol. 332).
- Ioannou, Y. A., Zeidner, K. M., Grace, M. E., & Desnick, R. J. (1998b). Human α -galactosidase A: Glycosylation site 3 is essential for enzyme solubility. *Biochemical Journal*, *332*(3), 789–797. <https://doi.org/10.1042/bj3320789>
- Iwai, H., Mikula, K. M., Oemig, J. S., Zhou, D., Li, M., & Wlodawer, A. (2017). Structural Basis for the Persistence of Homing Endonucleases in Transcription Factor IIB Inteins. *Journal of Molecular Biology*, *429*(24), 3942–3956. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2017.10.016>
- Iwai, H., Züger, S., Jin, J., & Tam, P. H. (2006). Highly efficient protein trans-splicing by a naturally split DnaE intein from *Nostoc punctiforme*. *FEBS Letters*, *580*(7), 1853–1858. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.02.045>
- Jeiranikhameneh, M., Moshiri, F., Keyhan Falasafi, S., & Zomorodipour, A. (2017). Designing Signal Peptides for Efficient Periplasmic Expression of Human Growth Hormone in *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *27*(11), 1999–2009. <https://doi.org/10.4014/jmb.1703.03080>
- Kapur, M., Nirula, S., & Naik, M. P. (2022). Future of anti-VEGF: biosimilars and biobetters. *International Journal of Retina and Vitreous*, *8*(2). <https://doi.org/10.1186/s40942-021-00343-3>
- Kesik-Brodacka, M. (2018). Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *65*(3), 306–322. <https://doi.org/10.1002/bab.1617>
- Kormanová, L., Rybecká, S., Levarski, Z., Struhárňanská, E., Levarská, L., Blaško, J., Turňa, J., & Stuchlík, S. (2020). Comparison of simple expression procedures in novel expression host *Vibrio natriegens* and established *Escherichia coli* system. *Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.06.003>
- Lagassé, H. A. D., Alexaki, A., Simhadri, V. L., Katagiri, N. H., Jankowski, W., Sauna, Z. E., & Kimchi-sarfaty, C. (2017). *Recent advances in (therapeutic protein) drug development*. 6. <https://doi.org/10.12688/f1000research.9970.1>
- Lee, K., Jin, X., Zhang, K., Copertino, L., Andrews, L., Baker-Malcolm, J., Geagan, L., Qiu, H., Seiger, K., Barngrover, D., McPherson, J. M., & Edmunds, T. (2003). A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology*, *13*(4), 305–313. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwg034>
- Lei, J., Chen, D. A., & Regnier, F. E. (1998). Rapid verification of disulfide linkages in recombinant human growth hormone by tandem column tryptic mapping. *Journal of Chromatography A*, *808*, 121–131. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00098-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00098-3)
- Levarski, Z., Šoltýsová, A., Krahulec, J., Stuchlík, S., & Turňa, J. (2014). High-level expression and purification of recombinant human growth hormone produced in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, *100*, 40–47. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.05.003>
- Li, Lian, J., Xue, H., Jiang, Y., Wu, M., Lin, J., & Yang, L. (2020). Enzymatic preparation of pyruvate by a whole-cell biocatalyst coexpressing L-lactate oxidase and catalase. *Process Biochemistry*, *96*(April), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.04.014>
- Li, Y. (2015). Split-inteins and their bioapplications. *Biotechnology Letters*, *37*(11), 2121–2137. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-1905-2>
- Lin, Y., Li, M., Song, H., Xu, L., Meng, Q., & Liu, X. Q. (2013). Protein trans-splicing of multiple atypical

- split inteins engineered from natural inteins. *PLoS ONE*, 8(4), e59516. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059516>
- Liu, J., Ekanayake, O., Santoleri, D., Walker, K., & Rozovsky, S. (2020). Efficient Generation of Hydrazides in Proteins by RadA Split Intein. *ChemBioChem*, 21(3), 346–352. <https://doi.org/10.1002/cbic.201900160>
- Lobstein, J., Emrich, C. A., Jeans, C., Faulkner, M., Riggs, P., & Berkmen, M. (2012). SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. *Microbial Cell Factories*, 11(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-56>
- Lu, W., Sun, Z., Tang, Y., Chen, J., Tang, F., Zhang, J., & Liu, J. N. (2011). Split intein facilitated tag affinity purification for recombinant proteins with controllable tag removal by inducible auto-cleavage. *Journal of Chromatography A*, 1218(18), 2553–2560. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.02.053>
- Lukas, J., Giese, A. K., Markoff, A., Grittner, U., Kolodny, E., Mascher, H., Lackner, K. J., Meyer, W., Wree, P., Saviouk, V., & Rolfs, A. (2013). Functional Characterisation of Alpha-Galactosidase A Mutations as a Basis for a New Classification System in Fabry Disease. *PLoS Genetics*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003632>
- Markets and Markets. (2021). *Protein Expression Market by Type (Escherichia Coli, Mammalian, Yeast, Pichia, Insect, Baculovirus and Cell-free), Products (Reagents, Competent Cells, Instruments, Services), Application, End-User and Region - Global Forecast to 2025*. <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/protein-expression-market-180323924.html>
- Matsuura, F., Ohta, M., Ioannou, Y. A., & Desnick, R. J. (1998). Human α -galactosidase A: characterization of the N-linked oligosaccharides on the intracellular and secreted glycoforms overexpressed by Chinese hamster ovary cells Human α -galactosidase A (α -Gal. In *Glycobiology* (Vol. 8, Issue 4). <https://academic.oup.com/glycob/article/8/4/329/677614>
- Mayes, J. S., Scheerer, J. B., Sifers, R. N., & Donaldson, M. L. (1981). Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 112(2), 247–251. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(81\)90384-3](https://doi.org/10.1016/0009-8981(81)90384-3)
- Meghdari, M., Gao, N., Abdullahi, A., Stokes, E., & Calhoun, D. H. (2015). Carboxyl-terminal truncations alter the activity of the human α -Galactosidase A. *PLoS ONE*, 10(2), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118341>
- Mills, K. V, Lew, B. M., Jiang, S., & Paulus, H. (1998). Protein splicing in trans by purified N-and C-terminal fragments of the Mycobacterium tuberculosis RecA intein. *Harvard Medical School*, 95, 3543–3548. www.pnas.org.
- Miraula, M., Enculescu, C., Schenk, G., & Mitić, N. (2015). Inteins — A Focus on the Biotechnological Applications of Splicing-Promoting Proteins. *American Journal of Molecular Biology*, 5(April), 42–56.
- Miyamura, N., Araki, E., Matsuda, K., Yoshimura, R., Furukawa, N., Tsuruzoe, K., Shirotani, T., Kishikawa, H., Yamaguchi, K., & Shichiri, M. (1996). COOH-terminal Truncation of Galactosidase A A Carboxy-terminal Truncation of Human-Galactosidase A in a Heterozygous Female with Fabry Disease and Modification of the Enzymatic Activity by the Carboxy-terminal Domain Increased, Reduced, or Absent Enzyme Activity Depending on Number of Amino Acid Residues Deleted Key words: X-linked disorder • de novo mutation • one base insertion • site-directed mutagenesis • electroporation. In *J. Clin. Invest* (Vol. 98, Issue 8).

- Modrego, A., Amaranto, M., Godino, A., Mendoza, R., Barra, J. L., & Corchero, J. L. (2021). *Molecular Sciences Human α -Galactosidase A Mutants: Priceless Tools to Develop Novel Therapies for Fabry Disease*. <https://doi.org/10.3390/ijms22126518>
- Nanda, A., Subhra Nasker, S., Mehra, A., Panda, S., & Nayak, S. (2020). *microorganisms Inteins in Science: Evolution to Application*. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8122004>
- Nguengang Wakap, S., Lambert, D. M., Olry, A., Rodwell, C., Gueydan, C., Lanneau, V., Murphy, D., Le Cam, Y., & Rath, A. (2020). Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *European Journal of Human Genetics*, 28(2), 165–173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>
- Ohashi, T. (2019). [Current status and future prospect of enzyme replacement therapy for Fabry disease]. *Rinsho shinkeigaku = Clinical neurology*, 59(6), 335–338. <https://doi.org/10.5692/clinicalneurolog.cn-001246>
- Passaglia Bernardes, T., Foresto, R. D., & Kirsztajn, G. M. (2020). Fabry disease: genetics, pathology, and treatment. *REV ASSOC MED BRAS*, 66(1), 10–16. <https://doi.org/10.1590/1806-9282.66.S1.10>
- Patra, A. K., Mukhopadhyay, R., Mukhija, R., Krishnan, A., Garg, L. C., & Panda, A. K. (2000). Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 18(2), 182–192. <https://doi.org/10.1006/prep.1999.1179>
- Perez-Perez, D. A., Pioquinto-Avila, E., Arredondo-Espinoza, E., Morones-Ramirez, J. R., Balderas-Renteria, I., & Zarate, X. (2020). Engineered small metal-binding protein tag improves the production of recombinant human growth hormone in the periplasm of *Escherichia coli*. *FEBS Open Bio*, 10(4), 546–551. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12808>
- Platt, F. M. (2018). Emptying the stores: lysosomal diseases and therapeutic strategies. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 17(2), 133–150. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.214>
- Pokora, W. (2020). *Comparison of the most important expression systems for the production of recombinant proteins*. May.
- Poole, L. B. (2015). The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radical Biology and Medicine*, 80, 148–157. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2014.11.013>
- Porro, D., & Mattanovich, D. (2004). Recombinant protein production in yeasts. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 267, 241–258. <https://doi.org/10.1385/1-59259-774-2:241>
- Qiu, H., Honey, D. M., Kingsbury, J. S., Park, A., Boudanova, E., Wei, R. R., Pan, C. Q., & Edmunds, T. (2015). *Impact of cysteine variants on the structure, activity, and stability of recombinant human α -galactosidase A*. <https://doi.org/10.1002/pro.2719>
- Ries, M. (2017). Enzyme replacement therapy and beyond-in memoriam Roscoe O. Brady, M.D. (1923-2016). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 40(3), 343–356. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0032-8>
- Rosano, G. L., Morales, E. S., & Ceccarelli, E. A. (2019). New tools for recombinant protein production in *Escherichia coli*: A 5-year update. *Protein Science*, 28(8), 1412–1422. <https://doi.org/10.1002/pro.3668>
- Saleh, L., & Perler, F. B. (2006). Protein splicing in cis and in trans. *Chemical Record*, 6(4), 183–193. <https://doi.org/10.1002/tcr.20082>
- Schillberg, S., Raven, N., Spiegel, H., Rasche, S., & Buntru, M. (2019). Critical analysis of the

- commercial potential of plants for the production of recombinant proteins. *Frontiers in Plant Science*, 10(June). <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00720>
- Schuller, Y., Hollak, C. E. M., & Biegstraaten, M. (2015). The quality of economic evaluations of ultra-orphan drugs in Europe – a systematic review. *Orphanet Journal of Rare Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0305-y>
- Selas Castiñeiras, T., Williams, S. G., Hitchcock, A., Cole, J. A., Smith, D. C., & Overton, T. W. (2018). Development of a generic β -lactamase screening system for improved signal peptides for periplasmic targeting of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Scientific Reports*, 8(1), 1–18. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25192-3>
- Seras-Franzoso, J., Díaz-Riascos, Z. V., Corchero, J. L., González, P., García-Aranda, N., Mandaña, M., Riera, R., Boullosa, A., Mancilla, S., Grayston, A., Moltó-Abad, M., Garcia-Fruitós, E., Mendoza, R., Pintos-Morell, G., Albertazzi, L., Rosell, A., Casas, J., Villaverde, A., Schwartz, S. J., & Abasolo, I. (2021). Extracellular vesicles from recombinant cell factories improve the activity and efficacy of enzymes defective in lysosomal storage disorders. *Journal of Extracellular Vesicles*, 10(5), e12058. <https://doi.org/10.1002/jev2.12058>
- Shah, N. H., & Muir, T. W. (2014). Inteins: Nature's gift to protein chemists. *Chemical Science*, 5(2), 446–461. <https://doi.org/10.1039/c3sc52951g>
- Shi, C., Meng, Q., & Wood, D. W. (2013). A dual ELP-tagged split intein system for non-chromatographic recombinant protein purification. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 829–835. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4601-3>
- Simonetta, I., Tuttolomondo, A., Di Chiara, T., Miceli, S., Vogiatzis, D., Corpora, F., & Pinto, A. (2018). Genetics and Gene Therapy of Anderson-Fabry Disease. *Current Gene Therapy*, 18(2), 96–106. <https://doi.org/10.2174/1566523218666180404161315>
- Smith, L. E., Yang, J., Goodman, L., Huang, X., Huang, R., Dressman, J., Morris, J., Silva, R. A. G. D., Davidson, W. S., & Cavigiolo, G. (2012). High yield expression and purification of recombinant human apolipoprotein A-II in *Escherichia coli*. *Journal of Lipid Research*, 53(8), 1708–1715. <https://doi.org/10.1194/jlr.D028043>
- Soares, C. R. J., Gomide, F. I. C., Ueda, E. K. M., & Bartolini, P. (2003). Periplasmic expression of human growth hormone via plasmid vectors containing the λ PL promoter: Use of HPLC for product quantification. *Protein Engineering*, 16(12), 1131–1138. <https://doi.org/10.1093/protein/gzg114>
- Stappers, F., Scharnetzki, D., Schmitz, B., Manikowski, D., Brand, S.-M., Grobe, K., Lenders, M., & Brand, E. (2020). Neutralising anti-drug antibodies in Fabry disease can inhibit endothelial enzyme uptake and activity. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 43(2), 334–347. <https://doi.org/10.1002/jimd.12176>
- Starokadomskyy, P. L., Okunev, O. V., Irodov, D. M., & Kordium, V. A. (2008). Utilization of protein splicing for purification of the human growth hormone. *Molecular Biology*, 42(6), 966–972. <https://doi.org/10.1134/S0026893308060198>
- Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S. T., Abeysinghe, S., Krawczak, M., & Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD s): 2003 Update. *Hum Mutat*, 21, 577–581. <https://doi.org/10.1002/humu.10212>
- Taurino, I., Reiss, R., Richter, M., Fairhead, M., Thöny-Meyer, L., De Micheli, G., & Carrara, S. (2013). Comparative study of three lactate oxidases from *Aerococcus viridans* for biosensing applications. *Electrochimica Acta*, 93, 72–79. <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2013.01.080>

- Upadhyay, V., Singh, A., Jha, D., Singh, A., & Panda, A. K. (2016). Recovery of bioactive protein from bacterial inclusion bodies using trifluoroethanol as solubilization agent. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0504-9>
- Vallejo, L. F., & Rinas, U. (2004). Strategies for the recovery of active proteins through refolding of bacterial inclusion body proteins. *Microbial Cell Factories*, 3, 11. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-3-11>
- Wang, H., Wang, L., Zhong, B., & Dai, Z. (2022). *Protein Splicing of Inteins : A Powerful Tool in Synthetic Biology*. 10(February), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.810180>
- Wojtowicz-Krawiec, A., Sokolowska, I., Smorawska, M., Chojnacka-Puchta, L., Mikiewicz, D., Lukaszewicz, N., Marciniak-Rusek, A., Wolinowska, R., Bierzynska-Krzysik, A., Porebska, A. J., Kuthan-Styczen, J., Gurba, L., Borowicz, P., Mazurkiewicz, A., Plucienniczak, G., & Plucienniczak, A. (2014). Use of Ubp1 protease analog to produce recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 113. <https://doi.org/10.1186/s12934-014-0113-4>
- Wu, W. Y., Miller, K. D., Coolbaugh, M., & Wood, D. W. (2011). Intein-mediated one-step purification of *Escherichia coli* secreted human antibody fragments. *Protein Expression and Purification*, 76(2), 221–228. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2010.12.004>
- Xu, M. Q., Paulus, H., & Chong, S. (2000). Fusions to Self-Splicing Inteins for Protein Purification. *Methods Enzymol*, 326, 376–418. [https://doi.org/doi:10.1016/s0076-6879\(00\)26066-7](https://doi.org/doi:10.1016/s0076-6879(00)26066-7).
- Zhang, W., Lu, J., Zhang, S., Liu, L., Pang, X., & Lv, J. (2018). Development an effective system to expression recombinant protein in *E. coli* via comparison and optimization of signal peptides: Expression of *Pseudomonas fluorescens* BJ-10 thermostable lipase as case study. *Microbial Cell Factories*, 17(1), 50. <https://doi.org/10.1186/s12934-018-0894-y>
- Zhang, X., Liu, X., & Meng, Q. (2019). Saudi Journal of Biological Sciences Engineered Ssp DnaX inteins for protein splicing with flanking proline residues. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(4), 854–859. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2017.07.010>
- Zhao, Q., Xu, W., Xing, L., & Lin, Z. (2016). Recombinant production of medium- to large-sized peptides in *Escherichia coli* using a cleavable self-aggregating tag. *Microbial Cell Factories*, 15(1), 136. <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0534-3>
- Zhou, Z.-R., Huang, W., Liu, K.-J., Lin, F.-L., Wang, X.-L., Wang, F., & Jiang, R. (2020). Soluble Expression, One-Step Purification and Characterization of Recombinant Human Growth Hormone Fused with ompA3 in *Escherichia coli*. *Protein and Peptide Letters*. <https://doi.org/10.2174/0929866527666201110123426>