

Facultad: Farmacia y Bioquímica.

Carrera: Bioquímica.

Sede: Mendoza

Curso: 4to año

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C.



Docentes:

- Pelegrina, Laura
- Quintero, Cristian
- Rinaldini, Estefanía

Estudiantes:

- Martín, Lucía - Mat. 8384
- Pérez Elizalde, Julieta - Mat 8417
- Valestra, Georgina - Mat 8461

Curso: Biotecnología

Fecha: 04/11/2022

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

Índice

Resumen.....	3
Palabras claves	3
Objetivo	3
Introducción.....	3
Desarrollo	4
Desarrollo de Interferón α -2b latente en <i>Pichia pastoris</i>	4
La construcción del plásmido para la expresión del INF α -2b.....	5
Desarrollo de Interferón α -2b glicosilado en <i>Escherichia coli</i>	6
Construcción del plásmido.....	6
Introducción de sitios de N -glicosilación en INF α -2b.....	7
Desarrollo in vivo de la glicosilación de GST-INF α en <i>Escherichia coli</i>	8
Conclusión.....	8
Bibliografía	9

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

Resumen

La producción de INF α -2b como proteína terapéutica para la Hepatitis C, es viable en *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. En *Pichia pastoris* se obtuvo INF α -2b latente mediante la fusión del dominio N-terminal o C-terminal de la proteína asociada a latencia (LAP) del factor de crecimiento transformante (TGF β) e INF α -2b. Mientras que, en *Escherichia coli*, se obtuvo INF α -2b glicosilado mediante la glicosilación de la proteína eucariota in vivo, utilizando una proteína citoplasmática N-glicosiltransferasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ApNGT), seguido de un alargamiento en la cadena del azúcar químico enzimática.

Palabras claves

INF α -2b - *Pichia pastoris* - *Escherichia coli*

Objetivo

Este review está centrado en la comparación de métodos distintos para la producción de INF α -2b latente y INF α -2b glicosilado, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*. Este INF α -2b es utilizado como tratamiento para muchas infecciones víricas, siendo la de nuestro interés la Hepatitis C.

Introducción

El virus de la Hepatitis C (VHC) es una de las principales enfermedades a nivel mundial, el cual infecta hasta el 3% de la población en el mundo. Es, además, la causa principal de enfermedad hepática crónica, provocando cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular. Gracias a la llegada de los productos biofarmacéuticos (productos de origen biológico) se ha logrado mejoras en la calidad de vida de los pacientes respecto a las enfermedades. El tratamiento de preferencia para el VHC es el interferón pegilado con ribavirina (ayuda a que el interferón se mantenga activo en el cuerpo por más tiempo).

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

El interferón alfa 2b (INF α -2b) es una glicoproteína (<30 kDa), perteneciente a las citocinas, que es generada por los leucocitos cuando el sistema inmunológico se activa frente a un patógeno. El INF α -2b es un interferón de tipo I, que tiene actividad antiviral inhibiendo la diseminación del virus, es antiproliferativo e inmunoregulador. Sin embargo, el uso de estas citoquinas tiene varios efectos secundarios (fatiga, síntomas gripales, neuropsiquiátricos, autoinmunes, isquémicos, etc.) debido a la vida en sangre corta, naturaleza pleiotrópica, la presencia de receptores en múltiples células y la capacidad de liberar varias citoquinas.

Es por este motivo que se torna interesante y necesaria la investigación de las distintas formas de producción de INF α -2b, y nos proponemos comparar la obtención de INF α -2b glicosilado y de INF α -2b latente.

Para la producción de esta proteína, se utilizan dos microorganismos: uno fúngico, *Pichia pastoris*; y uno bacteriano, *Escherichia coli*.

Pichia pastoris es un microorganismo metilotrófico (pueden utilizar compuestos reducidos de un solo átomo de carbono) que tienen la capacidad de lograr grandes densidades celulares generando grandes cantidades de proteínas heterólogas. Es alcohol oxidasa (AOX), por lo que es capaz de metabolizar metanol, siendo AOX el promotor fuerte y el más utilizado para la expresión de proteínas recombinantes, usando metanol como inductor.

Escherichia coli es una bacteria de rápido crecimiento, fácil de cultivar y manipular. Utiliza medios ricos en glucosa, extracto de levadura o peptona, que son compuestos económicos y con gran disponibilidad. Al igual que *Pichia pastoris*, nos permite obtener cultivos de alta densidad celular.

Es interesante lograr obtener proteínas glicosiladas, ya que puede interferir en propiedades funcionales y estructurales de las mismas. Esta bacteria no posee maquinaria post traduccional que nos permita obtener proteínas glicosiladas, por lo que se ha creado un sistema de glicosilación en *E. coli*.

En este review explicaremos y compararemos la forma de producir INF α -2b latente en *Pichia pastoris* e INF α -2b glicosilado en *Escherichia coli*.

Desarrollo

Desarrollo de Interferón α -2b latente en *Pichia pastoris*

La producción de INF α -2b latente se realiza mediante la fusión del dominio N-terminal o C-terminal de la proteína asociada a latencia (LAP) del factor de crecimiento transformante (TGF β) e INF α -2b, que tiene un sitio específico de escisión para la proteasa NS3 del virus de la hepatitis C (VHC), que luego solo se activará en el sitio de interés (hígado) debido a la proteasa viral (NS3 del VHC) que está en la superficie de las células infectadas.

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

En *Pichia pastoris* se expresaron las proteínas de fusión como homodímeros que luego in vitro fueron escindidas, utilizando la proteasa NS3 del VHC recombinante, en dos unidades correspondientes a INF α -2b y LAP.

La construcción del plásmido para la expresión del INF α -2b

Se fusionó la secuencia del gen LAP con la secuencia del gen de INF α -2b por el sitio de escisión de la proteasa NS3 del VHC como unión en ambas conformaciones a través de SOE-PCR. En el extremo 5' de cada gen de fusión de longitud completa (INF α -2b-NS3-LAP y LAP-NS3- INF α -2b), se agregó la secuencia del péptido sintético (histidina Kex2-espaciador Gly/Ser-sitio de enterocinasa) por el método de OPW-PCR (se utiliza para fabricar productos de genes quiméricos versátiles) y dichos genes, se amplificaron con éxito.

En cada gen de fusión, los cebadores utilizados introdujeron los sitios xbaI y xhoI, en el extremo 5' y 3'. Todos los genes de fusión se ligaron con un vector pPICZ α A, utilizando enzimas de restricción xbaI y xhoI. Se llamaron a los plásmidos "pPICZ α A-INF α 2b-NS3-LAP" y "pPICZ α A-LAP-NS3-INF α 2b". En ambos plásmidos, los genes están regulados por un promotor de alcohol oxidasa (AOXI), seguido se encuentra una señal que secreta el factor alfa de *Saccharomyces cerevisiae* que se encargan de exportar las proteínas fuera de la célula.

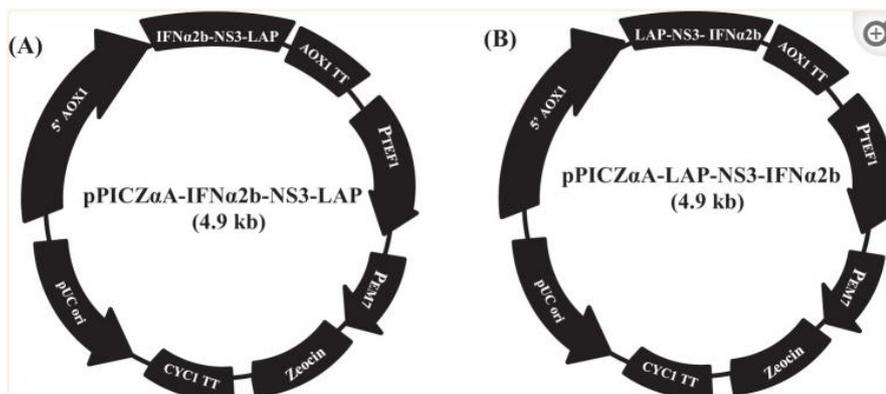


Figura 1: Plásmidos de expresión recombinante A- pPICZ α A-INF α 2b-NS3-LAP B- pPICZ α A-LAP-NS3-INF α 2b.

Fuente: "Development of latent Interferon alpha 2b as a safe therapeutic for treatment of Hepatitis C virus infection."

Tanto la clonación como la secuencia de genes se confirmaron mediante la secuenciación.

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

Desarrollo de Interferón α -2b glicosilado en *Escherichia coli*

Se glicosiló la proteína eucariota in vivo utilizando una proteína citoplasmática N-glicosiltransferasa de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ApNGT) en *E. coli* seguido de un alargamiento en la cadena del azúcar químico enzimática. Esto se realizó in vitro para poder producir la glicoproteína que tiene un N-glicano sialilado. Como proteína eucariota molde se utilizó el INF α -2b.

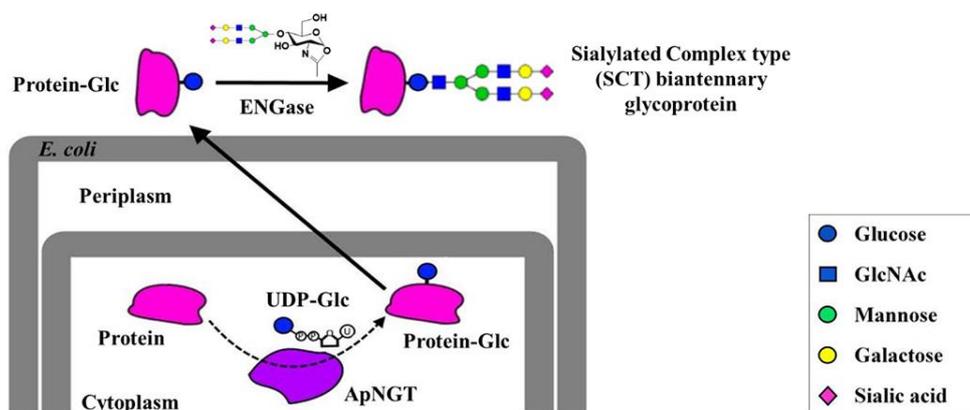


Figura 2: Esquema explicativo de la transglicosilación química enzimática de proteínas Eucariotas en *Escherichia coli* in vitro y la glicosilación in vivo catalizada por ApNGT.

Fuente: "Exploring a combined *Escherichia coli*-based glycosylation and in vitro transglycosylation approach for expression of glycosylated interferon alpha"

Se descubrió que, luego de la glicosilación in vivo positiva, la glicosintasa EndoCC-N180H transporta correctamente un N-glicano sialilado a INF α -Glc. El INF α -2b sialilado purificado demostró que puede inhibir a la reproducción celular esperada en una prueba en la que se evalúa la división celular y una gran estabilidad frente a la degradación de la enzima proteasa.

Construcción del plásmido

Los genes que codifican para el INF α -2b se modificaron con P4N. A este gen sintético INF α -P4N se le agregó una etiqueta GST N-terminal, que fue clonado en pGEX-4T-1 entre el sitio NotI y BamHI. La construcción de pGEX-GST-INF α -Q158N y pGEX-GST-INF α -WT se realizaron a partir de pGEX-GST-INF α -P4N usando un kit de mutagénesis. Luego el gen INF α -Q158N se pudo amplificar partiendo de pGEX-GST-INF α -Q158N y para ello se usó PfuUltra II Fusion High-fidelity DNA Polymerase y se clonó después en el vector pET28a (+) entre ambos sitios BamHI y NcoI.

Se agregó la etiqueta 6xHis N-terminal en pRT28a-INF α -Q158N. Se clonó en el vector pET45b la secuencia de ApNGT de tipo salvaje utilizando sitios KpnI/XhoI, en el vector pET28a utilizando sitios NdeI/XhoI y, por último, en el vector pBAD33.1 utilizando sitios NdeI/SalI.

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

Created with SnapGene®

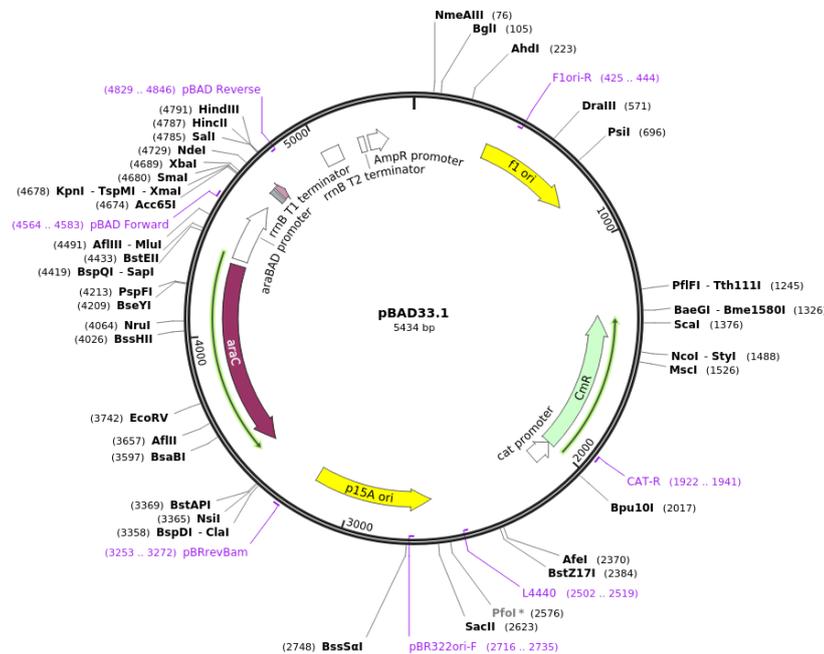


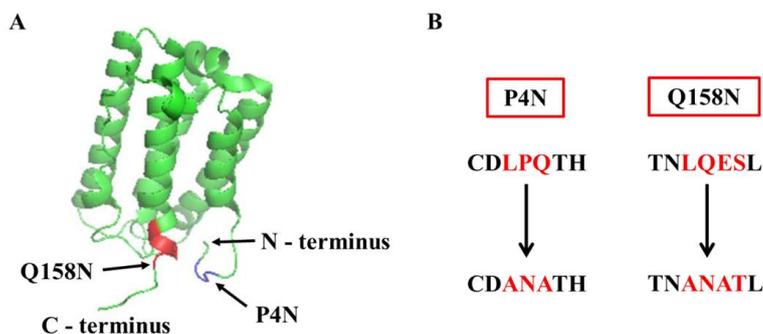
Figura 5: Plásmido recombinante.

Fuente: "Exploring a combined *Escherichia coli*-based glycosylation and *in vitro* transglycosylation approach for expression of glycosylated interferon alpha"

Introducción de sitios de N -glicosilación en INF α -2b

Para producir la N-glicosilación, se generó una variante de INF α que poseía cuatro sitios de N -glucano modificados genéticamente.

Se seleccionaron las posiciones Pro-4 (P4) y Gln-158 (Q158) para introducir un sitio de N -glicosilación, se modificaron para obtener una secuencia ANAT en determinadas posiciones y así realizar la glucosilación *in vivo* catalizada por ApNGT en *E. coli*.



Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

Figura 3: Estructura de INF α y sitio de N-glicosilación introducido

Fuente: "Exploring a combined *Escherichia coli*-based glycosylation and *in vitro* transglycosylation approach for expression of glycosylated interferon alpha"

Desarrollo in vivo de la glicosilación de GST-INF α en *Escherichia coli*.

Se diseñó una proteína de fusión con un glutatión-S-transferasa (GST) en el extremo N-terminal para que sea soluble dentro del citoplasma de la *E. coli*. Este diseño de la proteína de fusión permite que se libere el INF α se libere por escisión de una trombina por acción de una proteasa. Los GST-INF α -Q158N y GST-INF α -P4N, que son los mutantes, se expresaron con ApNGT para glicosilarlo en *E. coli* in vivo, se obtuvo un rendimiento de 50-70 mg/l.

Los resultados de espectrometría de masas, que se realizó de las proteínas de fusión recién purificadas, muestran que: GST-INF α -Q158N está glicosilada un 80% y GST-INF α -P4N está completamente glicosilada.

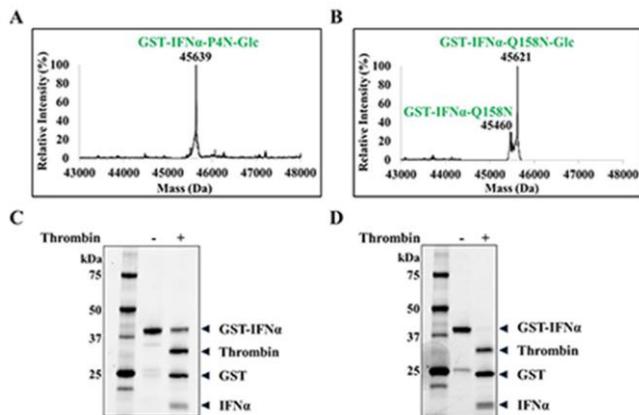


Figura 4: Perfiles de SDS-PAGE de las proteínas de fusión purificadas

Fuente: "Exploring a combined *Escherichia coli*-based glycosylation and *in vitro* transglycosylation approach for expression of glycosylated interferon alpha"

Conclusión

La utilización de *Pichia pastoris* para la producción de INF α -2b es adecuada ya que tienen la capacidad de lograr grandes densidades celulares generando grandes cantidades de proteínas.

Entre sus beneficios, podemos nombrar que posee un bajo costo, es rápido y fácil de usar.

Producción de Interferón alfa-2b, mediante la utilización de *Pichia pastoris* y *Escherichia coli*, para terapia de Hepatitis C

Además, esta proteína de fusión INF α -2b al ser modificada como citocina latente diseñada para evadir los efectos secundarios por la administración por vía sistémica, se obtiene como resultado la unión al sitio objetivo (hígado) cuando es activada por el contacto con la proteasa NS3 que se encuentra en la superficie de las células de VHC que están en división.

Gracias a lo anterior mencionado, se puede usar como tratamiento en combinación con antivirales de acción directa. Aun así, se necesitan hacer más pruebas en modelos animales para determinar la eficacia y seguridad en el organismo completo en pacientes con VHC.

En cuanto al desarrollo de INF α -2b N-glicosilado en *E. coli*, podemos concluir que es una proteína biológicamente activa y mejorada para que sea estable proteolíticamente. Esto nos da ventajas respecto al tratamiento de hepatitis C, ya que la obtención de proteínas en estas bacterias es fácil y de bajo costo.

Al poder generar la proteína glicosilada, obtenemos beneficios que incluyen mayor estabilidad molecular, respuestas farmacodinámicas moduladas y perfiles farmacocinéticos mejorados.

Bibliografía

- Gull, I., Aslam, MS, Tipu, I., Mushtaq, R., Ali, TZ y Athar, MA (2019) Development of latent Interferon alpha 2b as a safe therapeutic for treatment of Hepatitis C virus infection. *Scientific Report*, 9 (1), 10867. doi: [10.1038/s41598-019-47074-y](https://doi.org/10.1038/s41598-019-47074-y)
- S. Katla, B. Karmakar, S.R.R. Tadi, N. Mohan, B. Anand, U. Pal, S. Sivaprakasam (2019) High level extracellular production of recombinant human interferon alpha 2b in glycoengineered *Pichia pastoris*: culture medium optimization, high cell density cultivation and biological characterization. *Journal of Applied Microbiology*. doi: [10.1111/jam.14227](https://doi.org/10.1111/jam.14227)
- Atef Ayed 1, Imen Rabhi, Koussay Dellagi, Héla Kallel (2008) High level production and purification of human interferon α 2b in high cell density culture of *Pichia pastoris*. *Enzyme Microb Technol*. doi: [10.1016/j.enzmictec.2007.09.006](https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.09.006)
- <https://instituciones.sld.cu/facultadfinlayalbarran/2020/04/22/interferon-alfa-2b/#:~:text=Or%C3%ADgenes%20del%20interfer%C3%B3n,a%20las%20c%C3%A9lulas%20no%20infectadas>
- S. Kiran Prabhu , Q. Yang , X. Tong y Lai-Xi Wang (2021) Exploring a combined *Escherichia coli*-based glycosylation and *in vitro* transglycosylation approach for expression of glycosylated interferon alpha. *Bioorg Med Chem*. doi: [10.1016/j.bmc.2021.116037](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116037)