

EXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DEL PRECURSOR MONOMÉRICO DE INSULINA GLARGINA EN *Pichia pastoris*

Abel Caballero-Pérez, José María Viader-Salvadó, Martha Guerrero-Olazarán.
Instituto de Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.
San Nicolás de los Garza, N.L., México. C.P. 66455. martha.guerrero@uanl.edu.mx

Palabras clave: *Pichia pastoris*, insulina glargina

Introducción. La Diabetes mellitus es una de las mayores emergencias de salud en la actualidad. Se estiman 451 millones de personas con esta enfermedad el mundo (1). México tiene 12 millones de diabéticos (2) y más de un millón necesitan tratamiento farmacológico con insulina (IL). La IL glargina es un análogo de la insulina humana. La levadura metilotrófica *Pichia pastoris* ha demostrado ser un buen hospedero para la producción de IL (3). La cepa KM71 (Mut^s, His⁻) tiene funcional el gen AOX2 del promotor de la enzima alcohol oxidasa 2, por tanto, es capaz de emplear el metanol como fuente de carbono y regular la inducción para la secreción al medio de cultivo de la proteína heteróloga, y así facilitar el proceso de purificación.

El presente trabajo muestra la expresión y purificación del precursor de IL glargina a nivel de matraces agitados, en condiciones definidas.

Metodología. La secuencia de ADN que codifica para la IL glargina (ILGXN) se diseñó basándose en los codones preferenciales de *P. pastoris* y se incluyeron sitios de restricción (*Xho* I y *Not* I) en sus flancos para facilitar la inserción al vector de expresión pPIC9 de *P. pastoris*. La ligación entre el gen sintético y el vector de expresión se realizó con T4 Ligasa (EUA, PROMEGA) a una relación molar 1:3 vector:inserto. Con el plásmido recombinantes pPIC9/ILGXN se transformaron células *E. coli* TOP-10. Las colonias se seleccionaron mediante un medio selectivo (Agar/LB/Amp). El vector de expresión pPIC9/ILGXN se linealizó con Sal I, para transformar la cepa KM71 de *P. pastoris* con prototrofia a histidina. Las células electroporadas y transformadas se crecieron en medio selectivo (Agar/RBD/His⁻). La presencia del inserto en el plásmido recombinante y la integración al genoma de *P. pastoris* se confirmó mediante PCR y electroforesis en gel de agarosa. Las clonas *P. pastoris* KM71-pPIC9/ILGXN se cultivaron en matraz de 250 mL (25 mL de medio BMM), suplementado con MeOH (0.75 % (v/v)) cada 12 h, 250 rpm, 30 °C. Al sobrenadante del medio de cultivo libre de células se le determinó concentración de proteínas totales (método de Bradford). Las cepas con mayor índice de rendimiento (**Fig. 1A**) se analizaron por RP-HPLC y SDS-PAGE. El precursor de insulina glargina se logró purificar mediante la cromatografía de exclusión molecular en Biogel P-60 (Biorad, EUA). La identidad molecular se demostró por espectrometría de masas.

Resultados. Se diseñó y definió la secuencia de ILGXN (codifica para 53 aminoácidos de la IL glargina). El gen codificador fue obtenido por síntesis química. La clonación (pPIC9-ILGXN) y la presencia del casete de expresión en las células de KM71 de *P. pastoris* transformadas se confirmó por PCR (con oligonucleótidos que hibridan en la región promotora y terminadora de AOX1) y mostró un producto de 623 pb, corroborando la clonación y transformación. Las 81 clonas His⁺ obtenidas se cultivaron para inducir la expresión de la IL glargina. Al final del cultivo (48h) la OD_{600nm} fue de 38.5±2.77 y los valores de la determinación de concentración de proteínas totales en el sobrenadante de cultivo estuvo entre 7.7-59.4 µg/mL. El análisis del índice de rendimiento permitió seleccionar las clonas de mayor porcentaje (**Fig. 1A**), las cuales se analizaron por RP-HPLC (**Fig. 1B**) y SDS-PAGE.

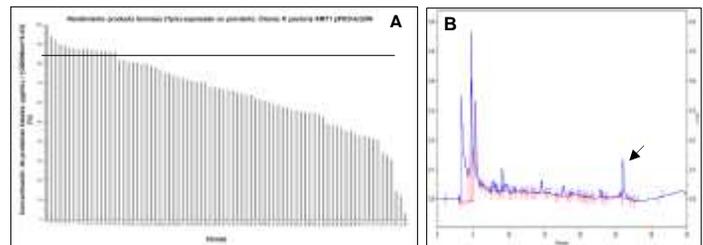


Fig. 1. A) Representación gráfica del rendimiento (proteínas totales (µg/mL)/(OD_{600nm}*0.23)). Los valores se expresan en porcentaje y se ordenan de forma decreciente. La línea horizontal muestra las clonas de mayor porcentaje. **B)** Perfil cromatográfico típico en RP-HPLC para las clonas seleccionadas. Columna: Ultrasphere Analytical C8, 5 µm, 300 °A, 4.6x250 mm. λ=220 nm, 30 °C, 1 mL/min. Gradiente: 20-92 % B en 27 min. Fase móvil, A: 0.1 % TFA en agua y B: 0.05 % TFA en 50 % ACN. La flecha indica el precursor de IL glargina.

El precursor de IL glargina se separó del resto de los contaminantes mediante una cromatografía de exclusión molecular en Biogel P60. Las muestras analizadas por SDS-PAGE mostró una banda de 6 kDa de peso molecular. La identidad molecular de la proteína de interés se determinó por MALDI-TOF.

Conclusiones. Se logró expresar, purificar y caracterizar al precursor de IL glargina.

Agradecimientos. ACP agradece a CONACYT por la beca otorgada (No. 615675).

Bibliografía.

1. Cho, N.H., et al. (2018). *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 138, 271-281.
2. Atlas I.D.F (2017). <http://www.idf.org/>
3. Gurrankonda, C., et al. (2010). *Microb. Cell Fact.*, 9(1), 31.