



CLONACIÓN *IN SÍLICO* DE RETEPLASE, UNA VARIANTE DEL ACTIVADOR TISULAR DEL PLASMINÓGENO HUMANO RECOMBINANTE, USANDO TECNOLOGÍA GATEWAY®.

Palabras clave: Reteplase, clonación, *in silico*, Bioinformática

Johana Carolina Ossa Tabares^{1,2}, Oscar Mauricio Gómez Guzmán^{1,3}, Ana María García Cepero^{1,2},

¹ Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias, Universidad de Antioquia, Medellín Colombia. kro.9418@gmail.com. ² Unidad de Biología Celular y Molecular, Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB, Medellín Colombia. ³ Facultad de Ciencias y Biotecnología, Universidad CES

Introducción. El activador tisular del plasminógeno humano (htPA) es una proteína fibrinolítica con aplicación clínica para degradar el trombo formado por el proceso de coagulación después de que existe un daño en los vasos sanguíneos⁽¹⁾. Actualmente se tiene disponibles formas sintéticas de htPA recombinantes (rt-PA)⁽²⁾. rt-PAs son enzimas proteolíticas utilizadas para el tratamiento de obstrucciones vasculares periféricas⁽³⁾, cardiovasculares⁽⁴⁾ y cerebrovasculares⁽⁵⁾ y se encuentran aprobados para uso clínico alteplase, tenecteplase y reteplase⁽²⁾. Reteplase es una variante del gen t-PA recombinante producida en *Escherichia coli*, ingrediente activo del medicamento Retavase® (Boehringer Mannheim Corporation). Está indicada principalmente para el tratamiento del infarto agudo de miocardio (IAM), con una marcada superioridad sobre otros rt-PAs, por su economía en la producción y por su mecanismo de acción mejorado⁽⁷⁾. El objetivo de este trabajo fue la obtención de la secuencia tanto del gen como de la proteína Reteplase y el desarrollo de estrategias de clonación *in silico* para la expresión de dicha proteína.

Metodología. Se realizó la búsqueda de la secuencia del gen tPA humano en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica, NCBI⁽⁸⁾ y de las secuencias proteicas del tPA humano, Alteplase, Tenecteplase y Reteplase en Uniprot⁽⁹⁾, artículos científicos o patentes⁽⁹⁾. Se realizó un análisis bioinformático con estas secuencias generando alineamiento, comparación y reconocimiento del ARNm de tPA, generando una secuencia consenso. Para el diseño de los constructos se obtuvo la secuencia de ácidos nucleicos optimizada para la expresión en *E. coli*, usando la aplicación GeneArt™ en su función GeneOptimizer. A continuación se agregaron los elementos necesarios en cada caso para la correcta clonación y expresión en los vectores elegidos. Posteriormente se modeló la clonación utilizando diversos vectores del sistema Gateway®: para clonación pDONR221 y pENTR/SD/D-TOPO y para expresión, la recombinación en los vectores de pDEST14, pDEST15 y pDEST17, utilizando el programa Geneious®. Finalmente se realizó amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del gen RetPat *in silico* usando los juegos de primer T7 forward y T7 reverse.

Resultados. Las secuencias halladas en la búsqueda de secuencias, su identificación, características y diferencias se observan en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Características y comparación de la secuencia de la proteína htPA con rt-PA Alteplase, Tenecteplase y Reteplase

Proteína	Características	Cambios frente a tPA humano
tPA humano NCBI: NG_023264.1 ⁽⁸⁾	Tamaño: 562 aminoácidos. Peso molecular: 62.917. Dominios F, EGF, K1, K2, P, puentes disulfuro 17, 3 glicosilaciones	Secuencia consenso
rtPA: Alteplase US patent 5728565 ⁽¹⁰⁾	Tamaño: 527 aminoácidos Peso molecular: 59.042 Dalton	No posee las siguientes secuencias: 1-22 péptido señal: MDAMKRGGLCCVLLGGAVFVSP; 23-32 propeptido: SQEIHARFR; 33-35 propeptido: GAR
rtPA: Tenecteplase DrugBank: DB00031 ⁽¹¹⁾	Tamaño: 527 aminoácidos. Peso molecular: 58.951 Dalton	Los mismos cambios de Alteplase y adicionalmente los siguientes cambios: T103→N, N117→G, K268H297R298R299→por cuatro A
rtPA: Reteplase US Patent Number 5,223,256 ⁽⁹⁾	Tamaño: 356 aminoácidos. Peso molecular: 39.589 Dalton. Dominios K2 y P, 3 puentes disulfuro, no tiene glicosilaciones	Se eliminan 3 de los 5 dominios estructurales que conforman tPA humano. Se conserva la secuencia de aminoácidos del 1 al 3 (SYQ) que coincide con la secuencia inicial del resto de las proteínas

A partir de esta búsqueda y comparación de secuencias, se obtuvo la secuencia consenso de aminoácidos la cual se denominó RetPat. RetPat fue exitosamente optimizada con sustitución de los codones utilizados con poca frecuencia y la eliminación del contenido extremo de guanina-citosina. Así, se obtuvo un constructo de **1161** nucleótidos con todos los elementos necesarios para la clonación. Al realizar la modelación

se obtuvo el vector pDONR221 RetPat de 3662 pares de bases (pb) y de su recombinación en pDEST14 (Fig. 1A), pDEST14 RetPat con un tamaño de 5744 pb. Para realizar la clonación en pENTR/SD/D-TOPO se realizó un paso inicial de amplificación por PCR *in silico* del gen RetPat con primers para adaptar secuencias adicionales compatibles con este vector, además de adicionar una secuencia de corte para la proteína del virus del tabaco (TEV) que permite la escisión controlada de las etiquetas de fusión presentes en estos vectores. El tamaño del fragmento obtenido en la amplificación *in silico* fue de 1078 pb el cual será utilizado para la simulación de la clonación en pENTR/SD/D-TOPO. Después de la simulación de la clonación del gen RetPat amplificado por PCR *in silico* en el vector pENTR/SD/D-TOPO se obtiene un vector con un tamaño de 3696 pb. En la recombinación en los vectores de expresión pDEST17 y pDEST15 (Fig. 1 B y C) se obtuvieron los vectores pDEST17 RetPat con un tamaño de 5851 pb y pDEST15 RetPat con un tamaño de 6510 pb. En todos los casos la comprobación de la correcta clonación de RetPat por PCR *in silico* mostro la obtención de fragmentos de 1283 pares de bases que incluye el gen RetPat verificando la presencia de bandas de tamaño molecular que coinciden con lo esperado. El marco abierto de lectura (ORF) de la proteína que se encuentra inmediatamente después del promotor, produjo una correcta traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos, dando como resultado la proteína sin ningún cambio.

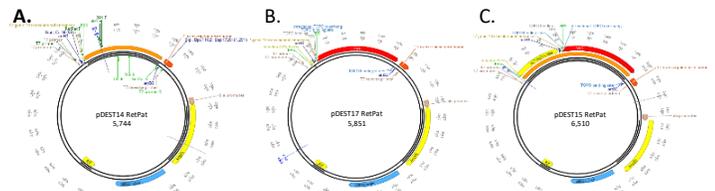


Fig.1. Vectores de expresión obtenidos de la modelación de la clonación que contienen el gen RetPat. **A.** pDEST14 RetPat. **B.** pDEST17 RetPat. **C.** pDEST15 RetPat

Conclusiones. Las herramientas bioinformáticas son útiles en la búsqueda y reconocimiento de la secuencia de la proteína y el diseño del constructo RetPat. El análisis *in silico* permitió el desarrollo de tres modelos de clonación y tres vectores de expresión eficientes (pDEST14 RetPat, pDEST15 RetPat y pDEST17 RetPat) que dan la pauta para realizar con éxito la clonación *in vitro*, siguiente paso para la obtención de la proteína recombinante.

Agradecimientos. Al CODI de la Universidad de Antioquia por la financiación del proyecto.

Bibliografía. 1. Rijken DC, et al. (1979). *Biochim Biophys Acta* 580: 140-53. 2. Gurman P, et al. (2015) *Clin Pharmacol Ther* 1-12. DOI:10.1002/cpt.33. 3. Lin M, et al. (2016). *Journal of vascular surgery* 64: 873-874. 4. Kalpesh S, *Indian Medical Gazette*; 145: 479-487. 5. Balucani C, et al. (2016) *J Stroke Cerebrovasc Dis* 25:894-901. 6. Smalling RW. (1997). *European Heart Journal*; 18: F11-6. 7. NCBI (2016). 8. UniProtKB - P00750 (TPA_HUMAN), (2018). 9. Penzberg AS, et al. (1993) *US Patent Number 5,223,256*. 10. Goeddel D, et al. (1998). *US Patent Number 5,728,565*. 11. Tenecteplase accession number DB00031. (2018)

