

**1. Título de la propuesta: Desarrollo de nuevos bioprocesos para la producción de nanocuerpos terapéuticos.**

**2. Cuerpo académico Biotecnología Celular y Tisular**

Línea de investigación del Cuerpo Académico o Grupo de Investigación: Ingeniería Metabólica

**3. Responsable del proyecto: Alvaro R. Lara (DPT, UAM-C)**

Participantes: Juan Carlos Sigala (DPT, UAM-C), Claudia Haydeé González (DCN, UAM-C), Guillermo Gosset (Instituto de Biotecnología-UNAM), José Utrilla Carreri (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM), Jochen Büchs (RWTH Aachen University)

**4. Orientación:**

- Investigación básica (X)
- Investigación aplicada (X),
- Desarrollo o adaptación ( ),
- Transferencia de tecnología ( ),
- Desarrollo de tecnología (X),
- Otros ( ). Especificar: \_\_\_\_\_

**5. Fecha de inicio y duración.**

Inicio: 3 de mayo de 2021; duración: 4 años

**6. Propuesta:**

**a. Resumen.**

En este proyecto se desarrollarán estrategias de producción de nanocuerpos integrando tres niveles de diseño: circuitos genéticos autoinducibles, hospederos con una mayor capacidad de producción, y novedosas estrategias de cultivo. Se desarrollarán circuitos autoinducibles por agotamiento de glicerol y por limitación de oxígeno. Los circuitos serán evaluados en cepas con sistemas de transporte de sustrato alternos, y cepas modificadas en la regulación del metabolismo aerobio. Las condiciones de producción serán encontradas en cribado a nivel de microbiorreactor empleando proteínas fluorescentes como modelo de producción. Las mejores condiciones de producción serán llevadas a biorreactor de 2 L para evaluar la producción de nanocuerpos, cuya efectividad será evaluada en pruebas inmunológicas *in vitro*. La presente propuesta integrará conocimientos de diversas disciplinas que beneficiarán la formación de los estudiantes que participen en él. Se integrarán además conceptos de biología sintética, que pretenden integrarse con una nueva UEA que se ofertará a estudiantes de las licenciaturas en ingeniería biológica y biología molecular. Se espera que los resultados puedan conducir a la publicación de artículos en revistas indizadas y generación de patentes.

**b. Antecedentes.**

La producción de biofármacos es un sector esencial de la economía moderna. Las proteínas recombinantes que para su actividad no requieren de modificaciones postraduccionales son preferentemente producidas en la bacteria *Escherichia coli*. Para este fin se emplean cultivos de alta densidad celular (conc. de biomasa mayor de 20 g/L, medida como peso seco), esquemas de cultivo por lote alimentado. Esta tecnología tiene algunas desventajas, como la necesidad de bombas adicionales y esquemas de control relativamente sofisticados. Además, los cultivos por lote alimentado son usualmente largos (48 h o más), lo que incrementa el costo del proceso. Es importante también contar con esquemas de inducción de la expresión que permitan controlar las etapas de síntesis de biomasa y de producto. Por otro lado, la bacteria *E. coli* es incapaz de exportar la proteína recombinante, por lo que la obtención del producto requiere procesos de ruptura celular costosos.

Estas desventajas podrían ser superadas mediante la aplicación de conceptos de biología sintética, ingeniería metabólica y esquemas de cultivo innovadores. En la presente propuesta se planea integrar la experiencia de nuestro grupo de trabajo en el diseño de cepas de *E. coli* con mejores capacidades metabólicas, con sistemas de cultivos simples que en conjunto permiten acumular altas densidades celulares en modo lote. Por ejemplo, hemos demostrado que cepas de *E. coli* con el sistema de fosfotransferasa inactivo permiten alcanzar altas densidades celulares en modo lote y significativamente más proteína recombinante que su cepa silvestre (Velázquez, 2020). Por otro lado, a medida que la concentración celular en el biorreactor incrementa, la capacidad de transferencia de masa en el mismo con frecuencia es insuficiente para mantener la demanda del metabolismo aerobio. En consecuencia, el oxígeno llega a ser limitante y ello afecta negativamente al cultivo, ya que se activan vías fermentativas que reducen la capacidad de producción del cultivo. En nuestro grupo de trabajo hemos desarrollado cepas que pueden mantener un mejor desempeño con baja disponibilidad de oxígeno, basadas en la expresión de la hemoglobina de *Vitreoscilla* hemoglobina (Jaén et al., 2019). Dichas cepas también tienen un menor sobreflujo metabólico, por lo que pueden ser cultivadas con concentraciones elevadas de glucosa y alcanzar altas densidades celulares. Esto las hace atractivas para cultivos industriales. Además, hemos demostrado que la reducción del proteoma es una alternativa eficiente para mejorar la producción de ADN plasmídico (De la Cruz et al., 2020).

Estos antecedentes serán tomados como base para el presente trabajo. Las cepas con el sistema de fosfotransferasa inactivo pueden consumir glucosa y glicerol simultáneamente, aunque la tasa de consumo de la primera es mucho más baja que la de la segunda (datos no publicados). Por lo tanto, es posible realizar cultivos con mezclas de sustratos en los que el consumo simultáneo de ambas fuentes de carbono resultan en una alta velocidad de crecimiento, y una vez agotado el glicerol, la velocidad de crecimiento disminuye y la síntesis de proteína recombinantes es muy alta (datos no publicados). Esto imita el comportamiento de un cultivo por lote alimentado, simplificando significativamente la operación del mismo. Sin embargo, para una mejor exploración de este sistema de expresión, se requieren sistemas de autoinducción por agotamiento de glicerol, lo cual no es trivial.

Por otro lado, hemos empleado la limitación de oxígeno como agente ambiental para activar la expresión de la proteína fluorescente FbFP, la cual no requiere oxígeno para emitir fluorescencia (Lara et al., 2017). Esto es atractivo si se emplean cepas de *E. coli* con un mejor desempeño ante condiciones microaerobias, como las desarrolladas en nuestro grupo. Hemos caracterizado el comportamiento de promotores microaerobios que pueden controlar eficientemente la expresión ante condiciones microaerobias, sin embargo, la expresión resulta ser más débil que empleando promotores constitutivos fuertes (Lara et al., 2017). Por lo tanto, es necesario diseñar un sistema de expresión microaerobia más potente. Además, es deseable contar con células más robustas y eliminar en lo posible la formación de metabolitos de fermentación, por lo que se partirá de una cepa con proteoma reducido para este fin a la que se le inactivará el gene de la proteína reguladora de la piruvato deshidrogenasa (Maeda et al., 2017).

El objetivo último del proyecto es desarrollar estrategias novedosas de producción de nanocuerpos. Los nanocuerpos se perfilan como una potente herramienta terapéutica. En principio, se producirá un nanocuerpo contra el SARS-CoV-2 de la librería reportada por Xiang y colaboradores (2020). Para eficientar la tecnología a desarrollar, se obtendrán cepas capaces de exportar la proteína mediante la mutación de genes clave como los compilados por Kleiner-Grote y colaboradores (2018).

## Referencias

- De la Cruz M, Ramírez EA, Sigala JA, Utrilla J, Lara AR. 2020. Plasmid DNA production in proteome-reduced *E. coli*. *Microorganisms*. 8:1444.
- Jaén KE, Velázquez D, Delvigne F, Sigala JC, Lara AR. 2019. Engineering *E. coli* for improved microaerobic pDNA production. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 42(9): 1457-1466.
- Kleiner-Grote GRM, et al. 2018. Secretion of recombinant proteins from *E. coli*. *Engineering in Life Sciences*. 18: 532-550.
- Lara AR, Jaén KE, Mühlmann M, Sigala JC, Regestein L, Büchs J. 2017. Characterization of endogenous and reduced promoters for oxygen-limited processes using *Escherichia coli*. *ACS Synthetic Biology*. 6: 344-356.
- Maeda S, et al. 2017. Pyruvate dehydrogenase complex regulator (PdhR) gene deletion boosts glucose metabolism in *Escherichia coli* under oxygen-limited culture conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 123(4), 437-443.
- Velázquez D. 2020. Tesis de Maestría en Ciencias Naturales e Ingeniería. Universidad Autónoma Metropolitana.
- Xiang S, et al. 2020. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2. *Science*. 370(6523):1479-1484.

### c. Objetivo general y objetivos particulares.

**Objetivo general:** Desarrollar una tecnología novedosa y simple para la producción de nanocuerpos por *Escherichia coli* a escala de cultivo de 2 L.

#### **Objetivos particulares:**

- i) Diseñar un sistema de expresión autoinducible por agotamiento de glicerol para la expresión de FbFP
- ii) Diseñar un sistema de expresión autoinducible por limitación de oxígeno para la expresión de FbFP
- iii) Caracterizar el funcionamiento del sistema autoinducible por agotamiento de glicerol en cepas de *E. coli* carentes del sistema de fosfotransferasa en cultivos con mezclas de glicerol y glucosa.
- iv) Obtener cepas de *E. coli* con proteoma mínimo, actividad fermentativa reducida y expresión constitutiva de la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria*.
- v) Caracterizar el funcionamiento del sistema autoinducible por limitación de oxígeno en cepas de *E. coli* rediseñadas para cultivos microaerobios (objetivo iv).
- vi) Modificar los mejores sistemas autoinducibles para expresar algún nanocuerpo de interés
- vii) Aplicar mutaciones para facilitar el exporte de proteínas en cepas de *E. coli* con sistema de fosfotransferasa alterno y la cepa rediseñada para cultivos microaerobios y caracterizar el exporte de proteína empleando las mejores condiciones para los sistemas autoinducibles diseñados.
- viii) Caracterizar la producción y eficiencia de exporte del nanocuerpo empleando autoinducción por agotamiento de glicerol o por limitación de oxígeno
- ix) Seleccionar el sistema más productivo y llevar a biorreactor de 2 L.
- x) Purificar el nanocuerpo producido y evaluar su actividad inmunológica.

### d. Descripción.

#### **Hipótesis**

La integración de sistemas de expresión autoinducibles, cepas modificadas genéticamente y esquemas de cultivo *ad hoc*, permitirán establecer estrategias de producción de nanocuerpos sencillas eficientes.

#### **Metodología**

Los sistemas de expresión autoinducida por agotamiento de glicerol serán un circuito de palanca (*toggle switch*) y un promotor seleccionado de un gene de *Escherichia coli* que se sobreexpresa en cultivos en glicerol, comparado a cultivos en glucosa. La evaluación de los circuitos se realizará en al menos tres cepas mutantes de las estudiadas por Velazquez (2020). Los sistemas autoinducibles por limitación de oxígeno se diseñaran expresando la polimerasa de ARN T7, seguida del gene de la FbFP bajo un promotor microaerobio de los evaluados por Lara y colaboradores (2017). Esto se hará con la intención de potenciar la expresión de la FbFP. Se evaluará la expresión microaerobia en cepas con proteoma reducido, mutantes en *pdhR* y expresando la hemoglobina de *Vitreoscilla stercoraria* fusionada a un péptido señal para su ubicación en periplasma. Las secuencias serán sintetizadas por un laboratorio especializado y clonadas en un vector de alto número de copias. El cribado se realizará en microbiorreactores, en colaboración con el Prof. Jochen Büchs de la Universidad Técnica de Aquisgrán, Alemania. Las mutaciones e inserciones se llevarán a cabo empleando métodos estándar.

La secuencia del gene del nanocuerpo se tomará del reporte de Xiang et al. 2007. Se insertará en los mejores circuitos de expresión en un plásmido de alto número de copias y se introducirá en cepas de segunda generación, capaces de exportar el nanocuerpo al medio de cultivo. Los cultivos de producción de nanocuerpos se llevarán a cabo en biorreactores instrumentados de 2 L disponibles en los laboratorios de la DCNI. El nanocuerpo se purificará por filtración por exclusión de tamaño y su actividad inmunológica será evaluada de acuerdo a lo descrito por Xiang y colaboradores, 2007.

#### e. Formación de recursos humanos.

El presente proyecto impactará en dos tesis de maestría sobre temas como: cribado de sistemas de expresión microaerobia, construcción de cepas mutantes, escalado a biorreactores de 1 L y evaluación de la respuesta inmune causada por los nanocuerpos.

#### f. Impacto esperado del proyecto.

Los resultados esperados pueden constituir una nueva tecnología para la expresión de proteínas recombinantes que incluye sistemas autoinducibles, cultivos de alta densidad celular en modo lote, y sistemas de exporte del producto. Se evaluará el caso particular de la producción de nanocuerpos, que representan una opción terapéutica atractiva. Por ello, se espera obtener resultados de interés no solo en el ámbito académico, sino también industrial. Los estudiantes graduados se beneficiarán de su entrenamiento sobre estas tecnologías y el desarrollo del proyecto contribuirá a enriquecer la UEA de Biología Sintética recientemente ofertada en la DCNI.

### 7. Recursos necesarios para el proyecto:

#### a. Financiamiento e infraestructura física y humana actual en el proyecto.

Actualmente se cuenta con un proyecto aprobado por CONACyT en el marco de la convocatoria de Investigación Científica Básica 2018 (*Esquemas de control dinámico para mejorar la producción de proteína recombinante en Escherichia coli*) para financiar los primeros dos años del proyecto. Para la segunda parte se planea someter propuestas a patrocinadores nacionales e internacionales en cuanto se publiquen convocatorias. Los laboratorios de la DCNI cuentan con el equipo y experiencia para la modificación genética de bacterias, cultivos en pequeña escala y biorreactores instrumentados de 1 L, así como equipo para el análisis inmunológico básico planteado.

#### b. Presupuesto calendarizado.

Año	Presupuesto estimado
1	\$ 300,000 M.N.
2	\$ 300,000 M.N.
3	\$ 300,000 M.N.
4	\$ 400,000 M.N.

#### c. Fuentes de financiamiento externas.

Se buscará apoyo del CONACyT y otras fuentes para la segunda parte del proyecto (últimos 1.5 años).

### 8. Calendario de actividades en periodos trimestrales.

Trimestre	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Objetivos	<i>i y ii</i>	<i>iii</i>	<i>iii</i>	<i>iv</i>	<i>v</i>	<i>vi</i>	<i>vi y vii</i>	<i>vii</i>	<i>viii</i>	<i>viii</i>	<i>ix</i>	<i>ix</i>

### 9. Información para el seguimiento del proyecto:

Se presentarán informes anuales comparando objetivos vs. resultados a la DCNI.

**a. Calendarización de productos esperados a lo largo del proyecto.**

<b>Año</b>	<b>Producto</b>
1	Sistemas de expresión de FbFP autoinducida caracterizados en microbiorreactores.
2	Obtención de cepas de segunda generación caracterizadas y sistema de expresión de nanocuerpo. Publicación de un artículo con los resultados del primer año.
3	Caracterización de la producción y exporte de nanocuerpos en microbiorreactores. Escalado a biorreactor instrumentado de 1 L. Graduación de un alumno de maestría.
4	Purificación de los nanocuerpos y comprobación de su actividad inmunológica. Redacción de un segundo artículo y patente. Graduación de un alumno de maestría.

**b. Resultados esperados, según sea el caso, en términos de conocimiento producido, productividad científica, desarrollo tecnológico, formación de recursos humanos e impacto, o cualquier otra que, a juicio del Responsable y de los participantes en el proyecto, sirva para realizar una adecuada evaluación de seguimiento.**

Los entregables esperados son: dos publicaciones en revistas indizadas, dos tesis de maestría y una solicitud de patente ante el IMPI.