



LA TERAPIA DE REPLAZO ENZIMÁTICO EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES GENÉTICAS

Homero Sáenz^{1,2}, Luis Alejandro Barrera¹

¹Instituto de Errores Innatos del Metabolismo. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

²Decanato de Medicina, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Barquisimeto, Venezuela.
E-mail: abarrera@javeriana.edu.co

RESUMEN

La terapia de remplazo enzimático (TRE), consiste en suministrarle a un paciente una proteína exógena, que en su organismo está siendo sintetizada anormalmente. La proteína puede provenir de tejidos y fluidos humanos, ser sintetizada en bacterias, células de mamífero o levaduras, a las cuales se les ha introducido el gen correspondiente. Actualmente son tratadas con TRE las enfermedades de Gaucher, Fabry y la inmunodeficiencia humana combinada. Además existen avanzados estudios en las enfermedades de Hurler, Hunter, Pompe, Niemann-Pick tipo B, Morquio A, angioderma hereditario y pénfigo vulgar. Una de las limitantes de la TRE ha sido sus altos costos, debido al relativamente pequeño número de pacientes que se tratan a nivel mundial y a que el sistema usado hasta ahora, es decir, la expresión en células de mamífero, requiere procedimientos muy costosos. La expresión en bacterias o levaduras sería mucho más barato, pero las primeras no expresan proteínas glicosiladas que constituyen el 91% del total de proteínas y la mayoría de las levaduras tienen sistemas de glicosilación, distintos a los de mamíferos. Sin embargo, *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha* parecen producir proteínas muy similares a las humanas, con lo cual se evitan los problemas de rechazo por parte del organismo humano. En el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) de la Pontificia Universidad Javeriana se adelantan estudios conducentes a la implementación de un sistema de expresión de proteínas recombinantes en levaduras para uso clínico en enfermedades lisosomales como los síndromes de Hunter y Morquio A. Este modelo, si funciona a cabalidad, podría emplearse para la mayoría de las enfermedades lisosomales (42 en total) y para otros errores innatos del metabolismo.

Palabras clave: Hunter, Morquio A, expresión de proteínas, *pichia pastoris*., proteínas recombinantes, terapia de remplazo enzimático.

ABSTRACT

The aim of enzyme replacement therapy (ERT), is to provide a foreign protein to a patient who is producing it abnormally. The protein to be used may be purified from human fluids or tissues and from bacteria, yeast or mammalian cells in which the corresponding human gene has been introduced. Up to now three diseases are currently being treated worldwide with ERT, Gaucher, Fabry and the combined severe human immunodeficiency. Advanced studies are in progress for the following diseases Hurler, Hunter, Pompe, Niemann-Pick B type, Morquio A, hereditary angioderma and *penfigo vulgar*. One of the problems of using ERT is the its high costs, due to both the low number of patients affected world-wide and the very expensive procedures required to obtain protein expression in mammalian cells. To overcome these problems there are two possible alternatives: expression in bacteria or in yeast, however bacteria do not glycosylate proteins and most of inborn errors of metabolism are caused by deficiency in glycosylated proteins (GP). Yeast glycosylate proteins, but they have different pattern of glycosylation from mammalian

cells. These differences lead to antigenicity problems and wrong orientation to target tissues. However, *Pichia pastoris* and *Hansenula polymorpha* seem to produce recombinant proteins very similar to the human ones. Therefore, it is expected that the problems of rejection by the human organism may be overcome. The Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) is successfully advancing in the implementation of expression for recombinant glycosylated proteins of clinical use in two lysosomal diseases: Hunter and Morquio A syndromes. The *Pichia pastoris* expression system, if viable in these two diseases, may be used for the majority of the lysosomal disorders (42 altogether) and for others Inborn Errors of metabolism due to deficiency in GP. Glycosylated proteins amount to about 91% of the known proteins.

Key words: Hunter, Morquio A, enzyme replacement therapy, expression of protein, *pichia pastoris*, recombinant proteins.

INTRODUCCIÓN

Como es ampliamente conocido la diabetes, es una enfermedad en la cual se produce un desorden en el metabolismo de la glucosa que conduce, entre otras manifestaciones, a daños en el riñón y en vasos sanguíneos como los de pequeño diámetro del ojo que eventualmente comprometen la retina. Los defectos en los vasos también conducen a mala circulación y con esto, problemas en la curación de las heridas, especialmente en los pies, produciendo lo que se conoce con el nombre de pie diabético, cegueras, úlceras crónicas, coma diabético y muerte si no se trata oportunamente. En 1921 Banting y Bates encontraron que esos defectos eran debidos a la falta de insulina, una proteína que se sintetiza en el páncreas y comenzaron a tratar a los perros diabéticos con extractos de páncreas demostrando que la falta de insulina era la responsable de las alteraciones metabólicas.

A partir de estos experimentos se pensó en la posibilidad de tratar a los pacientes con diabetes empleando insulina animal. Con el uso de la insulina bovina fue posible evitar la muerte prematura de muchas personas. Sin embargo, el organismo humano distingue lo que le es propio y mediante su sistema inmunológico rechaza aquello que le es extraño. La insulina está compuesta por 51 aminoácidos y, al igual que otras proteínas, es diferente entre una y otra es-

pecie. Mientras más diferencias puedan presentarse entre la proteína animal y la humana, mayor será la posibilidad de que el cuerpo humano reaccione contra ella. Hay una región de la proteína que es la que más reconoce el sistema inmune, es la responsable de la antigenicidad y un cambio de uno o más aminoácidos en esa zona, determina que el organismo reaccione más o menos intensamente. En términos generales mientras mayores diferencias existan en el contenido de aminoácidos de las proteínas humana y la animal que queremos usar para el tratamiento de los diabéticos, más la rechazará el organismo. Éste desata una respuesta, mediante la producción de anticuerpos, que hace que la insulina animal pierda su efectividad como medicamento y en ocasiones origine reacciones de rechazo que pueden ser muy severas para el paciente.

Para corregir ese problema, se cambió la fuente de la insulina y en los pacientes que reaccionaban contra la insulina bovina fue usada la de cerdo. Esta última sólo difiere de la humana en uno de los 51 aminoácidos y el organismo humano la tolera bastante bien por su alto grado de similitud con la que le es propia. Al cambiar el aminoácido diferente en la insulina de cerdo, se logró una insulina "idéntica" a la humana en cuanto a la composición de los aminoácidos.

La síntesis de las proteínas está codificada en los genes y éstos tienen los mismos componentes en todos los seres vivos, desde los virus hasta el hombre. A pesar de estar compuestos por los mismos elementos, el gen de la insulina de un animal como el perro, es distinto del humano y los virus y bacterias no sintetizan esta hormona. Sin embargo, la maquinaria para la síntesis de las proteínas es la misma, así que se pensó que si se insertaba el gen de la insulina humana en una bacteria, ésta podría sintetizar insulina idéntica a la del hombre. En la década de los setenta se pusieron a punto las técnicas para aislar los genes, insertarlos en el genoma de otras células y lograr que expresaran las proteínas de interés. De esta manera se logró que una bacteria, la *Escherichia coli*, que usualmente no produce insulina, la sintetizara al insertarle el gen humano correspondiente. Esta hormona tiene buena actividad y no produce reacciones adversas. En el año 1982 la oficina de Drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA) dio la licencia para empleo en humanos y su uso se extendió por todo el mundo. De hecho, la mayoría de la insulina que se usa en el tratamiento de la diabetes es sintetizada en esa bacteria. Usando esta metodología se han producido interferón α , vacuna antihepatitis B, interferón α -2b, activador tisular del plasminógeno, vacuna anti-influenza, eritropoyetina, interferón α -n3, interferón γ -1b, factor estimulante de colonias de granulocitos, factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos, interleukina-2, factor VIII de la coagulación sanguínea para uso en hemofilia, DNAsa que se emplea en la fibrosis quística, interferón β para la esclerosis múltiple. Sin embargo las proteínas son diferentes y no todas pueden ser expresadas en bacterias. De hecho, es posible que sólo menos del diez por ciento de las proteínas de interés terapéutico puedan sintetizarse en esos organismos. El empleo de la tecnología del ADN recombinante usando células de organismos con capacidad de glicosilar

péptidos, como es el caso de las levaduras, permitirá expresar glicoproteínas recombinantes para ser empleadas, igual que en la diabetes, en tratamientos de terapia de remplazo enzimático (TRE) de enfermedades hasta ahora incurables.

En el presente artículo se discuten algunos aspectos históricos de la TRE, su empleo actual y la potencialidad de su uso para terapéutica en enfermedades genéticas en Colombia.

Terapia de remplazo enzimático y terapia génica

En la actualidad se conocen más de 4000 enfermedades genéticas, dentro de las cuales se encuentran los errores innatos del metabolismo (Beudet A.L. *et al*, 2001). De éstas, muchas son incapacitantes o fatales y la mayoría de ellas no tienen tratamiento farmacológico convencional. Dado que son patologías incurables, su manejo clínico, tradicionalmente, se ha dirigido a corregir o prevenir algunas de las manifestaciones clínicas mediante dietas, como en el caso de acidemias orgánicas y los desórdenes de aminoácidos (Lipkin P.H. *et al.*, 1998; Basthaw M.L. *et al.*, 2001), mientras que en las mucopolisacaridosis, se han empleado procedimientos paliativos como el trasplante de córnea, el uso de audífonos o la terapia ortopédica (Rummelt V. *et al*, 1992; Pronicka E. *et al.*, 1988). El tratamiento ideal en estos casos debe ser aquel que pueda implementarse en etapas muy tempranas de la vida y con esto, prevenir la aparición de esas sintomatologías y las secuelas a largo plazo.

Los grandes hallazgos biotecnológicos, a partir de los años ochenta, tales como la clonación del ADN, la síntesis de oligonucleótidos, aislamiento y empleo de enzimas que cortan o pegan fragmentos de ADN y la ingeniería genética de plásmidos bacterianos, revolucionaron la investiga-

ción en biomedicina y proporcionaron la base experimental para iniciar el desarrollo de terapéuticas no convencionales. Actualmente se adelantan protocolos para remplazar o suplementar los genes defectuosos por medio de la terapia génica o proveer enzimas funcionales a los tejidos en los cuales están ausentes o son deficientes, mediante la TRE.

Los primeros protocolos clínicos de terapia génica de células somáticas aparecieron en la década de los noventa. A partir de entonces, más de 4.000 pacientes llevan en sus cuerpos células modificadas mediante ingeniería genética (Templeton N.S. and Lasic D.D., 2000; Wiley.co.uk/genetherapy). Aunque la terapia génica se presenta como la solución esperada por largo tiempo para el tratamiento de un gran número de enfermedades intratables, los resultados en algunos de los pacientes sometidos a este procedimiento, han demostrado que aun no se han logrado los niveles óptimos de transferencia y expresión de los genes exógenos (Scollary R., 2001; Zoltick P.W. and Wilson J.M., 2001). Esto ha obligado a que su empleo se haya restringido, mientras se desarrollan sistemas más eficientes de transferencia de los genes terapéuticos y se profundice en el conocimiento sobre los mecanismos de expresión y regulación genética de esos genes exógenos en las células transfectadas.

En la actualidad la TRE se considera como la alternativa más viable a corto plazo para el tratamiento de las enfermedades de origen genético y existe un número considerable de enfermedades para las cuales se está intentando desarrollar este tipo de terapia. Entre las enfermedades genéticas tratadas con terapia de remplazo enzimático, podemos citar la inmunodeficiencia combinada (SCID) para la cual se emplea la adenosina deaminasa (ADA) de bovino en el tratamiento de la forma severa (Hilman B.C. and Sorensen R.U., 1994), la enferme-

dad de Gaucher tipo I (Brady R.O. and Barton N.W., 1974) en la cual se utiliza la β -glucocerebrosidasa y más recientemente la enfermedad de Fabry con el uso terapéutico de la α -galactosidasa A (Brady R.O. and Schiffman R., 2000). El éxito de estas dos formas de terapia de remplazo enzimático, especialmente en la enfermedad de Gaucher tipo I, donde el tratamiento no sólo ha logrado detener la enfermedad sino revertir la mayoría de los síntomas preexistentes, ha dado un gran impulso al desarrollo de las técnicas de expresión de proteínas recombinantes y su caracterización bioquímica, para su potencial uso en terapia de remplazo enzimático, con lo cual se ha abierto una ventana de esperanza para el tratamiento de enfermedades genéticas. Otras enfermedades metabólicas con avanzados estudios para TRE son la MPS I, la enfermedad de Pompe, la enfermedad de Niemann-Pick tipo B, deficientes en las enzimas lisosómicas α -L-iduronidasa, α -glucosidasa y la esfingomielinasa (Genzyme Co., 1999). Igualmente se realizan estudios en las patologías del angioderma hereditario en donde existe deficiencia del inhibidor de la C1-esterasa y del péngfigo vulgar en donde existe una respuesta autoinmune a la desmogleina-3 (Genzyme Co., 2001).

Historia de la terapia de remplazo enzimático

Los estudios tendientes al desarrollo de protocolos de TRE se iniciaron a mediados de los años sesenta e inicios de los setenta (Brady R.O. *et al* 1965; Brady R.O. *et al.*, 1973; Brady R.O. and Barton N.W., 1974; Jonson W.G. *et al.*, 1973) y demostraron que la terapia de remplazo enzimático, como alternativa terapéutica era factible, siempre y cuando, se pudieran obtener cantidades suficientes de la enzima humana estable, no antigénica, con alta actividad específica y con la señal biológica que le

permitiera llegar a las células y compartimientos subcelulares del paciente.

En estudios clínicos preliminares, usando enzimas purificadas de tejidos o fluidos humanos, se trabajó con tres enzimas: la hexosaminidasa A (Jonson W.G. *et al.*, 1973), la α -galactosidasa A (Brady R.O., *et al.* 1973) y la β -glucocerebrosidasa (Brady R.O. *et al.*, 1966; Brady R.O. and Barton N.W., 1974), cuyas deficiencias son responsables de las enfermedades de Tay-Sachs, Fabry y Gaucher, respectivamente.

La enfermedad de Tay-Sachs es una patología neurodegenerativa producida por una deficiencia en la enzima hexosaminidasa A, que origina la acumulación del gangliósido GM2. Existen tres tipos: infantil, juvenil y adulto. Los pacientes presentan debilidad progresiva, hipotonía, pobre control de la cabeza, pérdida de la atención y entre los diez a doce meses pierden ciertos patrones de desarrollo adquiridos. La muerte ocurre generalmente antes de los cinco años. La forma adulta está acompañada de ataxia y demencia progresiva, pérdida del habla y convulsiones. Las formas tardías son heterogéneas con sintomatología variable entre los miembros de una misma familia.

La hexosaminidasa A, aislada de orina humana, se inyectó en un paciente con la enfermedad de Tay-Sachs y aunque la enzima no llegó hasta el sistema nervioso central, se observó una reducción en plasma del 43% de los globósidos, es decir, los esfingolípidos acumulados en esta enfermedad (Jonson W.G. *et al.*, 1973).

La enfermedad de Fabry es causada por la deficiencia de la enzima lisosomal α -galactosidasa A con acumulación de glicosfingolípidos neutros en la mayoría de los tejidos y fluidos del cuerpo. Los principales síntomas son sensación de calor en brazos y piernas, dolor en las extremidades

tan severo que a veces llevan al paciente al suicidio, lesiones cutáneas conocidas como angioqueratomas, poca sudoración y en la mayoría de los pacientes daños oculares especialmente en la cornea. Algunos presentan manifestaciones psiquiátricas como depresión y tendencias suicidas. Los síntomas tardíos de la enfermedad son problemas cardiacos y renales que pueden llevar a diálisis crónica o trasplante. Dos pacientes con enfermedad de Fabry recibieron aplicación intravenosa de la α -galactosidasa A, obtenida a partir de placenta humana, lo que condujo a una reducción en sangre de la ceramidatrihexósido, lípido acumulado en esta patología, (Brady R.O. *et al.*, 1973).

La enfermedad de Gaucher es un defecto en el metabolismo de los gangliósidos, en el cual no se descompone el glucocerebrósido en sus dos componentes glucosa y cerebrósido. El glucocerebrósido se acumula en los macrófagos que son células sanguíneas que migran a órganos como el hígado, el bazo, el riñón y en algunos pacientes a las células nerviosas. El defecto en el gen de la glucocerebrosidasa y su consiguiente deficiencia en la enzima es la responsable de la acumulación de la sustancia especialmente en hígado, bazo, hueso y pulmón. Dado que la médula ósea es la responsable de la producción de células sanguíneas, gran parte de los síntomas están asociados con baja producción de células sanguíneas: glóbulos blancos, glóbulos rojos y plaquetas. Dependiendo del lugar en que se afecte la proteína, hay o no acumulación excesiva de metabolitos y daño en el sistema nervioso. La enfermedad de Gaucher se divide en tres tipos. El Gaucher tipo 1 que compromete hígado, bazo y hueso. El dos en el cual hay compromiso neurológico severo y los pacientes mueren en la infancia temprana. Hay un subtipo intermedio en el cual hay compromiso neurológico pero leve.

En el caso de la enfermedad de Gaucher, la enzima aislada de placenta humana fue

aplicada, vía intravenosa, a dos pacientes que mostraron reducción de los glucocerebrósidos en macrófagos, los cuales constituyen las células blanco para la TRE en esta enfermedad. Aunque hubo una aparente reducción de los glucocerebrósidos en otros tejidos, realmente se produjo una redistribución de los mismos, en eritrocitos y plasma (Brady R.O. *et al.*, 1974). En los años ochenta, se avanzó en la extracción de la β -glucocerebrosidasa de placenta y se modificaron enzimáticamente los residuos de carbohidratos con el propósito de incrementar su captación por los macrófagos (Furbis F.S. *et al.*, 1981; Takasaki S. *et al.*, 1984). Desde comienzos de la década de los noventa, la β -glucocerebrosidasa recombinante producida en células de ovario de hámster chino (CHO) y modificada para dirigirla a los macrófagos se ha usado como una enzima de segunda generación para TRE en la enfermedad de Gaucher (Grabosky G.A. *et al.*, 1995). El éxito con esta terapia estimuló a grupos de investigación, tanto académicos como de la industria farmacológica, a iniciar estudios tendientes al empleo de TRE para otras enfermedades. Los resultados obtenidos indican que la TRE se presenta a corto plazo como la medida terapéutica de mayor factibilidad para el manejo de forma eficiente y más económica de pacientes con enfermedades hasta ahora incurables.

Generalidades de la TRE

El principio de la TRE es proporcionar al paciente la enzima deficiente, la cual debe tener las mismas características de la proteína humana. Esto implica la superación de una serie de problemas como la obtención de la molécula en cantidades suficientes, estable químicamente, activa, no antigénica y con las propiedades químicas que le permitan ser dirigida a los tejidos en los cuales no existe en forma funcional. En este orden de ideas, la obtención de la proteína en cantidades

clínicamente útiles constituye uno de los principales factores limitantes en la implementación de TRE y en definitiva es lo que aumenta desproporcionadamente los costos de un tratamiento de este tipo. La obtención de la proteína con fines terapéuticos a partir de órganos humanos o fluidos corporales como la placenta o el plasma ha sido útil, pero además de la baja disponibilidad de tejidos y el peligro de transmisión de enfermedades, la separación de proteínas humanas a partir de sus fuentes naturales ha sido difícil y laboriosa. Los bajos volúmenes obtenidos, los altos costos, los largos períodos de tiempo empleados y el riesgo existente de patógenos presentes en tejidos y fluidos corporales, tales como los causales de hepatitis, VIH, priones y otros que eventualmente pudieran estar presentes en los procesos de obtención de la molécula de utilidad terapéutica han hecho que se busquen otras fuentes de enzima.

Otro aspecto fundamental a considerar en la TRE, es la direccionalidad de la enzima, lo cual debe ser contemplado a dos niveles: el órgano y la célula blanco. La deficiencia enzimática puede estar localizada en el espacio extracelular, en el citosol o en un compartimiento subcelular, en cuyo caso, la enzima exógena normal debe atravesar varias barreras naturales. En el caso de espacios extracelulares como el tracto gastrointestinal o el plasma, éstos constituyen blancos de fácil acceso. La suplementación de enzima pancreática en la fibrosis quística (Nousia-Arvanitakis S., 1999) o la ADA en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa (Hilman B.C and Sorensen R.U., 1994), son claros ejemplos de esto. Para una enzima soluble en el citoplasma, es necesario atravesar la membrana plasmática y con ese propósito existen varias alternativas que aunque están siendo empleadas en la suplementación de algunos fármacos, para la TRE han sido poco exploradas. Entre

estos mecanismos tenemos los liposomas (Zelphati O. *et al.*, 2001) que se fusionan con la membrana plasmática y posteriormente liberan su contenido al espacio intracelular. Igualmente, la utilización de la propiedad de las cápsides de virus, como el de la influenza o el sendai, de adherirse a la superficie celular y causar internalización de la partícula viral (Ratazi C.M. and Dobrenis K., 1991) para construir vesículas combinadas conteniendo la molécula de utilidad terapéutica. También han sido útiles toxinas bacterianas, como la del tétano o sustancias vegetales, como el ricino, que permiten la difusión hacia el citoplasma de proteínas hidrofílicas, que normalmente no pueden atravesar la zona hidrofóbica que constituye la doble capa lipídica membranar. Sin embargo, el problema de direccionalidad de la molécula se complica cuando ésta debe alcanzar el lumen de una organela como la mitocondria o el peroxisoma, en cuyo caso tiene que ser transportada a través de otra(s) membrana(s), lo que adiciona la necesidad de otra señal biológica que permita que el sistema de transporte membranar reconozca y traslade esa molécula hasta su destino final (Gillis L. and Kaye E., 2002). En el caso de las enfermedades lisosomales, como las mucopolisacaridosis, esto último no es problema pues la enzima lisosómica no requiere atravesar la membrana de la organela ya que gracias a los procesos de endocitosis, existe una vía de comunicación directa con el espacio extracelular (Alberts B. *et al.*, 2002). El lisosoma constituye el sitio de depósito de los metabolitos no degradados y esta acumulación es responsable de las manifestaciones de las enfermedades genéticas de este tipo. De tal manera que la fusión de vesículas endocitadas conteniendo la enzima normal con vesículas conteniendo complejos moleculares no degradados, es en esencia el principio de la TRE de las enfermedades de depósito lisosomal (Kaye E.M., 2001).

En TRE se ha empleado la vía intravenosa para la administración de la enzima, lo cual resulta en una dilución en la circulación general o en el direccionamiento hacia otros tejidos. Esto es menos grave cuando el tejido hepático es el blanco, pero se acentúa cuando la enzima debe dirigirse a otros órganos, como por ejemplo el sistema nervioso central. Esto último ha llevado a pensar en la posibilidad de una administración directa por cateterización arterial, lo que solventa los problemas de necesidad de altas concentraciones de la enzima terapéutica y la pérdida a nivel hepático. Con relación al nivel celular, recordemos que la vía de ingreso es mediante procesos de endocitosis mediada por receptores y es interesante conocer algunos aspectos relativos al tema, pues esta etapa es crucial para la TRE. Existen evidencias experimentales que señalan que la presencia de la enzima normal en el espacio extracelular no resulta necesariamente en una eficiente internalización molecular, puesto que los tipos celulares presentan diferente capacidad para adicionar a su interior las moléculas exógenas, como en la gangliosidosis GM2, en cuyo caso la hexosaminidasa A es endocitada en cantidades superiores por los astrocitos tipo I, comparados con células indiferenciadas epiteloideas. Al respecto, cationizaron la enzima conjugándola con poli-lisina, lo que condujo a un aumento en la adsorción a la membrana y su posterior internalización (Brady R.O and Barton N.W., 1991). Otra enzima modificada con el propósito de lograr una mayor eficiencia en su empleo clínico fue la ADA que se conjugó con polietilenglicol (PEG). El tiempo de permanencia en el plasma aumentó de 30 minutos a 30 horas, se inhibió la proteólisis y disminuyó la antigenicidad (Hershfield M.S. and Chaffe S., 1991). La enzima N-acetilgalactosamina 4-sulfato sulfatasa, deficiente en el síndrome de Maroteaux Lamy, fue igualmente modificada buscando mejorar el direccionamiento hacia el tejido cartilagenoso. Esta enzima

fue derivatizada con polisina o con etildiamino para que cationizada difundiera más fácilmente a través de matriz extracelular, lográndose un nivel importante en el caso miocárdio y aceptable para otros órganos (Byers S. *et al.*, 2000). En las células blanco, si bien los receptores reconocen un ligando, la especificidad puede variar. En este sentido, las neuronas tienen afinidad por la toxina tetánica, gracias a que posee un alto contenido de gangliósidos y un fragmento de 50 KDa es retenido por las neuronas sin resultar tóxico. Aprovechando esto, se fusionó ese fragmento a la hexosaminidasa A, resultando internalizada en mayor proporción que la normal en animales de experimentación (Rattazi C.M. and K. Dobrenis, 1991). El caso más llamativo de modificación de la molécula terapéutica, por su eficiencia, lo constituye la β -glucocerebrosidasa. Esta enzima tiene en su parte terminal de la cadena glicosilada los azúcares ácido siálico y galactosa que debieron ser secuencialmente eliminadas para exponer residuos de manosa que son reconocidos por los receptores de manosa de macrófagos, que mostraban poca capacidad de endocitosis de la enzima sin modificar.

Aunque los anteriores hallazgos consolidaron la idea de la necesidad de modificaciones para el mantenimiento en el plasma de la enzima útil terapéuticamente o el aseguramiento de su reconocimiento a nivel celular, recientemente la lipasa ácida lisosomal, deficiente en las enfermedades de Wolman y Wilson, en las cuales hay almacenamiento de esteres de colesterol, fue expresada en *Pichia pastoris* y sin necesidad de ningún tipo de modificación química a nivel de laboratorio fue empleada para TRE en ratones con deficiencia de la enzima, logrando disminuir los niveles de colesterol en intestino, hígado y bazo (Du *et al.*, 2001).

Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

El uso de enzimas en TRE exige previamente la producción y purificación de dichas moléculas en cantidades suficientes para efectuar estudios de cinética de expresividad, caracterización bioquímica, bioactividad, estabilidad y aun modificarlas químicamente, si es el caso, antes de ser ensayadas en modelos animales y su posterior empleo en terapia humana. Sin embargo, cabe destacar que la obtención y purificación de proteínas a partir de sus fuentes naturales para estudios de estructura y función con el propósito de ser empleadas con fines terapéuticos ha sido difícil y laborioso. Los bajos niveles de actividad obtenidos por esta vía, los altos costos, los largos períodos de tiempo empleados y los avances en el conocimiento de la estructura, función, regulación y manipulación de los genes han dado paso a la producción de proteínas con la tecnología del DNA recombinante en modelos biológicos, que han permitido obtener un producto similar al humano. Dentro de estas posibilidades se han probado los cultivos de bacterias, levaduras y líneas celulares de mamíferos. Puesto que las bacterias no pueden glicosilar, no pueden emplearse para la expresión de proteínas glicosiladas y aunque las líneas celulares procedentes de células de mamíferos como la línea celular de ovario de hamster chino (CHO), fibroblastos humanos o células linfoblastoides son sistemas tradicionalmente utilizados para la expresión de glucoproteínas, su manipulación es compleja, costosa, de bajo rendimiento y las proteínas expresadas no siempre son estables o correctamente ensambladas, por lo cual el rendimiento es bajo (Hockney R.C., 1994; Ma D. 2001; Millat G. *et al.*, 1997). La expresión de proteínas y su posterior escalado en modelos como las levaduras ha resultado una metodología rápida, eficiente y a muy bajo cos-

to. Así, resultados de estudios recientes (Eckart M.R. and Bussineau C.M., 1996; Potapovich M.V. *et al.*, 2001; Cregg J.M. *et al.*, 1993; Cereghino G.P. and Cregg J.M., 1999) presentan a las levaduras metilotróficas como excelentes modelos de expresión de proteínas humanas.

Perspectivas

No cabe duda que los éxitos obtenidos hasta ahora en TRE para enfermedades de depósito lisosomal son debidos a la implementación de modelos biológicos capaces de producir proteínas recombinantes similares a las humanas con niveles aceptables de bioactividad, estables y susceptibles de remodelaciones químicas capaces de proporcionarles la señal biológica que permite su direccionamiento a los lisosomas. Si bien hoy día, sólo cerca de una decena de enfermedades, hasta ahora incurables, se están tratando mediante TRE y otras siete están en fase final de experimentación, la posibilidad de usarla para otro grupo importante de estas entidades, está ahora muy próxima. Al respecto en Colombia, el Instituto de Errores Innatos del Metabolismo (IEIM) de la Pontificia Universidad Javeriana, ha dedicado parte de sus esfuerzos investigativos a las áreas de terapia de remplazo enzimático y terapia génica para enfermedades de tipo lisosomal. El IEIM para realizar sus investigaciones ha dotado un laboratorio con tecnología apropiada y además cuenta con la colaboración de instituciones como la Universidad del Valle, El Instituto Nacional de Salud, Sheffield Children's Hospital (Inglaterra), Saint Louis University y North Carolina University (USA), Gifu University (Japón), y con el financiamiento de instituciones como el Banco de la República, Colciencias, Genzyme, la Embajada del Japón y la Pontificia Universidad Javeriana. En este laboratorio están siendo desarrollados una serie de proyectos de investiga-

ción bajo la responsabilidad de un equipo multidisciplinario que persigue generar conocimiento básico y aplicado en las áreas mencionadas. Para esto se ha avanzado en la expresión con fines clínicos de las proteínas humanas deficientes en las enfermedades de Hunter y Morquio A en la bacteria *Escherichia coli* y en las levaduras metilotróficas *Pichia pastoris* y *Hansenula polymorpha*.

La iduronato 2-sulfato sulfatasa (IDS), enzima deficiente en la enfermedad de Hunter, ha sido expresada, en *Escherichia coli* (Landázuri P., *et al.*, 2002a) y en *Pichia pastoris* (Landázuri P., *et al.*, 2002b). Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que la enzima producida en *Escherichia coli* se expresó en forma activa y fue procesada de manera similar a la enzima producida en líneas celulares de mamíferos (Millat G. *et al.*, 1997; Froissart R. *et al.*, 1995). Estos resultados muestran que en bacterias el procesamiento de la enzima hasta su forma madura y activa fue independiente de las glicosilaciones, lo cual representa un aporte significativo al conocimiento general de la expresión de proteínas humanas en bacterias. Con respecto a la expresión de la IDS en *Pichia pastoris*, la enzima al igual que en *Escherichia coli*, fue procesada hasta sus formas maduras de manera similar a la encontrada en las células de mamíferos (Millat G. *et al.*, 1997; Froissart R. *et al.*, 1995). Estos resultados, han permitido iniciar estudios para el escalado de la expresión y actualmente se avanza en la purificación de la enzima recombinante, lo cual permitirá en el mediano plazo, su caracterización y el inicio de los estudios en modelos animales de experimentación, como paso previo al empleo en terapia humana. La obtención en cantidades suficientes de la IDS recombinante permitirá su caracterización bioquímica y el estudio de sus patrones de glicosilación, con el propósito de modificarla si fuera necesario para

su direccionamiento. Sin embargo, en cuanto a la producción de enzimas lisosómicas humanas, se ha demostrado que las expresadas en levaduras, específicamente en *Pichia pastoris* sufren a nivel del retículo endoplásmico y complejo de Golgi modificaciones glicosídicas y le son adicionados fundamentalmente residuos de manosa. Por lo tanto, no es necesario remodelarlas químicamente para su uso en TRE en enfermedades en que los macrófagos son las células blanco (Du H. *et al.*, 2001). Esto último, a diferencia de las glicoproteínas expresadas en células CHO que presentan residuos de galactosa y ácido siálico, como se demostró con la β -glucocerebrosidasa recombinante obtenida en esta línea celular, la cual tuvo que modificarse para su uso en la enfermedad de Gaucher (Grabosky G.A. *et al.*, 1995).

Adicionalmente, se han logrado avances en la expresión de la IDS en *Hansenula polymorpha* y de la Acetilgalactosamina 6-Sulfato Sulfatasa (GALNS) en *Pichia pastoris*. La consolidación del sistema de expresión será de utilidad no sólo para el abordaje de las mencionadas enfermedades sino que permitirá realizar estudios en un gran número de las 42 enfermedades de depósito lisosomal. Además, por ser un sistema de expresión de proteínas glicosiladas podrá ser empleado para la producción de hormonas, factores de crecimiento y otras glicoproteínas con utilidad terapéutica.

LITERATURA CITADA

- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER P. *Molecular Biology of Cell*. Fourth edition. Garland Science. New York. 2002, 1463 p.
- BATSHAW ML, MACARTHUR RB, TUCHMAN M. *Alternative pathway therapy for urea cycle disorder*. J. Pediatr. 138: (1 suppl):S46-S54; discussion 2001, 554-555.
- BEAUDET A.L., SCRIVER C.R., SLY W.S, and VALLE D. Genetics, Biochemistry, and Molecular Basis of Variant Human Phenotypes. In Scriver C.R., Beudet A.L., Sly WS., Valle D. (Eds). *The metabolic and molecular bases of inherited Disease*, vol. I. 8th ed. International edition. McGraw-Hill, Inc. 2001, 3-128.
- BRADY R.O., KANFER J.N., SHAPIRO D. *The metabolism of glucocerebrosides II*. Evidence of an enzyme deficiency in Gaucher's disease. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1965, 18: 221-228.
- BRADY R.O., KANFER J.N., BRADLEY R.M. *Demonstration of a deficiency of glucocerebroside-cleaving enzyme in Gaucher's disease*. J Clin Invest. 1966, 45: 1112-1115.
- BRADY R.O., PENTCHEV P.G., GAL A.E., LEAHY W.R., QUIRK J.M., DEKABAN A.S. *Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: use of purified Ceramidetrihexosidase in Fabry's disease*. N Engl J Med. 1973, 289: 9-14.
- BRADY R.O., and BARTON N.W. *Replacement therapy for inherited enzyme deficiency: use of purified glucocerebrosidase in Gaucher's disease*. N Engl J Med. 1974, 291: 989-993.
- BRADY R.O and. BARTON N.W. Enzyme Replacement for Type I Gaucher Disease. In: Desnick R. (Ed). *Treatment of Genetic Diseases*. 1991, 153-167.
- BRADY R.O, SCHIFFMANN R. Clinical features of and recent advances in therapy for Fabry disease. *JAMA*. 2000, 284: 2771-2775.

- BYERS S, CRAWLEY A, BRUMFIELD L.K, NUTTAL J.D and HOPWOOD J.J. Enzyme Replacement Therapy in a Feline Model of MPS: Modification of Enzyme Structure and Dose Frequency. *Pediatric Research* 2000, 47: 745-749.
- CEREGHINO G.P. and CREGG J.M. *Applications of Yeast in Biotechnology: Protein Production and Genetic Analysis*. *Curr Opin Biotechnol.* 1999, 10: 422-427.
- CREGG J.M., VEDVICK T.S., RASCHKE W.C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Bio/technology (NY)* 1993, 11: 905-910.
- DU H., SCHIAVI S., LEVINE M., MISHRA J., HEUR M. and GRABOWSKI G.A. Enzyme therapy for lysosomal acid lipase deficiency in the mouse. *Human Molecular Genetics.* 2001, 10: 1639-1648.
- ECKART M.R. and BUSSINEAU C.M. *Quality and Authenticity of Heterologous Proteins Synthesized in Yeast*. *Curr Opin Biotechnol.* 1996, 7: 525-530.
- FROISSART R., MILLAT G., MATHIU M., BOZON D., MAIRE I. *Processing of iduronate 2-sulphatase in human fibroblasts*. *Biochem. J.* 1995, 309: 425-430.
- FURBIS F.S., STEER C.J., KRETT N.L., BARRANGER J.A. *Uptake and distribution of placental glucocerebrosidase in rat hepatic cells and effects of sequential deglycosilation*. *Biochem Biophys Acta.* 1981, 673: 425-434.
- GENZYME. *A rare kind of care. Committed to life-enhancing therapeutic solutions for patients with rare genetic diseases worldwide*. Genzyme Corporation. Cambridge. 1999.
- GENZYME. *Una alternativa de vida. Folleto informativo. Genzyme General Terapéuticos*. Boston. 2001, 20 p.
- GILLIS L, KAYE E. *Diagnosis and management of mitochondrial diseases*. *Pediatr. Clin. North Am.* 2002, 49: 203-219.
- GRABOSKY G.A., BARTON N.W., PASTORES G., DAMBROSIA J.M., BANERJEE T.K., MAKEE M.A., PARKER C., SCHIFFMANN R., HILL S.C., BRADY O. *Enzyme therapy in type I Gaucher's disease: Enzyme replacement therapy in Gaucher's disease: Comparative efficacy of mannose-terminated glucocerebrosidase from natural and recombinant sources*. *Ann. Intern. Med.* 1995, 22: 33-39.
- HERSHFIELD M.S and CHAFFE S. PEG-Enzyme Replacement Therapy for Adenosine deaminasa Deficiency. In: Desnick R. (Ed). *Treatment of Genetic Diseases*. 1991, 169-182.
- HILMAN B.C., SORENSEN R.U. *Management options: SCIDS with adenosine deaminase deficiency*. *Ann. Allergy.* 1994, 72: 395-402.
- HOCKNEY R.C. Recent developments in heterologous protein production in *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol.* 1994, 12: 456-463.
- JOHNSON WG, DESNICK RJ, LONG DM, SHARP HL, KRIVIT W, BRADY B, BRADY RO. *Intravenous injection of purified hexosaminidase A into a patient with Tay-Sachs disease*. *Birth Defects* 1973, 9: 120-122.
- KAYE E M. *Lysosomal Storage Diseases*. *Curr. Treat. Options Neurol.* 2001, 3: 249-256.
- LANDÁZURI P, DELGADO J., POUTOU R., GUNTURIZ M.L., GOMEZ L., SÁENZ H., ECHEVERRI O.Y., BARRERA L.A. (2002a). *Expresión of Human Iduronate Sulfatase (hIDS) in the yeast Pichia pastoris*. *Annual World Symposium on Lysosomal*

- Storage Disorders. Baltimore, USA. Octubre 14-15.
- LANDÁZURI P., DELGADO J., TORRES A.L., POUTOU R., GUNTURIZ M.L., GÓMEZ L., SÁENZ H., ECHEVERRI O.Y., BARRERA L.A. (2002b). Expresión Transiente de la Iduronato 2-Sulfato Sulfatasa Humana Funcionalmente Activa en *Escherichia coli*. XXXVII Congreso Colombiano de Ciencias Biológicas. Pasto, Colombia. 1-4 Octubre.
- LIPKIN P.H., ROE C.R., GOODMAN S.I., BATSHAW M.L. A case of glutaric acidemia type I: Effect of riboflavin and carnitine. *J. Pediatr.* 1988, 112: 62-65.
- MA D. Applications of yeast in drug discovery. *Prog. Drug Res.* 2001, 57: 117-162.
- MILLAT G., FROISSART R., MAIRE I., BOZON D. IDS transfer from overexpressing cell to IDS-deficient cell. *Exp. Cell Research* 1997, 230: 362-377.
- NOUSIA-ARVANITAKIS S. Cystic fibrosis and the pancreas: recent scientific advances. *J Clin Gastroenterol.* 1999, 29: 138-142.
- POTAPOVICH M.V., ERYOMIN A.N., ARZUKEVICH I.M., CHERNIKEVICH I.P and METELITZA D.I. Isolation, Purification and Characterization of Catalase from Methylotropic Yeast *Pichia Pastoris*. *Biochemistry (Moscow)* 2001, 66: 646-657.
- PRONICKA E., TYLKI-SZYMANSKA A., KWAST O., CHIMIELIK J., MACIEJKO D., CEDRO A. Carpal tunnel syndrome in children with mucopolysaccharidoses: Needs for surgical tendons and median nerve release. *J. Ment. Defic. Res.* 1988, 32: 79-82.
- RATTAZI C.M. and K. DOBRENIS. *Enzyme Replacement: Overview and Prospects In: Treatment of Genetic Diseases.* Desnick R. (Ed). 1991, 131-151.
- RUMMELT V., MEYER H.J., NAUMANN G.O. Light and electron microscopy of the cornea in systemic mucopolysaccharidoses type I-S (Scheie syndrome). *Cornea.* 1992, 11: 86-92.
- SCOLLAY R. *Gene therapy: a brief overview of the past, present, and future.* *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2001, 953: 26-30.
- TAKASAKI S., MURRAY G.J., FURBIS S., BRADY R.O., BARRANGER J.A. KOBATA A. Structure of N-Asparagine-linked oligosaccharides units of human placental b-glucocerebrosidase. *J Biol Chem.* 1984, 250: 10112-10117.
- TEMPLETON N.S. and LASIC D.D. *Gene Therapy. Therapeutic Mechanisms and Strategies.* Marcel Dekker Inc. New York. 2000, 584 p.
- ZELPHATI O., WANG YAN, KIDATA S., REED J.C., FELGNER P.L., CORBEIL J. *Intracellular Delivery of Proteins with a New Lipid-mediated Delivery System.* *J Biol Chem.* 2001, 276: 33103-35110.
- ZOLTICK P.W. and WILSON J.M. *Regulated gene expression in gene therapy.* *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2001, 953: 53-63.

Recibido: 16/04/2003

Aceptado: 11/09/2003