

Semillas de tabaco no comercial como biorreactor para la producción estable y a altos niveles de proteínas heterólogas complejas de interés farmacéutico y veterinario

Autoría principal

Abel Hernández Velázquez¹, Alina López Quesada¹, Yanaysi Ceballo Cámara¹, Kenia Tiel González¹, Osmani Ramos González¹, Marlene Pérez Martínez¹.

Otros autores

Gleysin Cabrera Infante¹, Humberto García Cruz², Merardo Pujol Ferrer¹, Yamilka Rosabal Ayan¹, Osvaldo Oliva Barbón¹, Liliana Mirabal Ortega¹, Rosabel Pérez Castillo¹, Aleines Ferreira Fabrè¹, Gil Enríquez Obregón¹, Julia Noda Gómez³, Pastor Alfonso Zamora³.

Colaboradores

Ernesto M. González Ramos¹, Alain González Pose¹, Carlos Montero Espinosa¹, Luis Valentín Poso¹, Fidel Rodríguez León¹, Yandiesky Lowery Veitía¹, Otto Mendoza León¹, Willian Ferro Vicet¹, José Montero Navarro¹, Rodolfo Valdés Veliz¹, Sigifredo Padilla García¹, Leonardo Gomez Bayolo¹.

Entidades ejecutoras principales

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Entidades participantes

³ Instituto de Investigaciones del Tabaco (IIT). Mayabeque, Cuba.

⁴ Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Mayabeque, Cuba.

Autor para correspondencia

Abel Hernández Velázquez.

División de Biotecnología de las Plantas. Investigaciones Agropecuarias.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Ave 31 entre 158 y 190, Reparto Cubanacán, Playa. Habana, Cuba. Apartado Postal 6162.

Fax: 273 1779.

Teléfono: 7250 4371

E. mail: abel.hernandez@cigb.edu.cu

Resumen

La utilización de la plantas como biorreactores para la producción de proteínas de interés farmacéutico, veterinario e industrial se ha consolidado como una alternativa atractiva por los beneficios que reporta. Los sistemas de plantas más establecidos y generalizados utilizan las hojas como tejido hospedero a pesar de los bajos niveles de expresión de las proteínas recombinantes, lo cual continúa siendo el principal reto de esta plataforma productiva. Entre las estrategias que se ha evaluado en los últimos años para incrementar la expresión de proteínas heterólogas en plantas, la producción y acumulación de estas en semillas parece ser una alternativa con importantes ventajas sobre las hojas. Además, en las semillas es donde ocurre la síntesis y el almacenamiento de las proteínas de reserva del embrión de forma natural, existe una baja actividad de proteasas y de contenido de agua, lo cual facilita la conservación prolongada de forma estable del material almacenado.

Esto implica una ventaja adicional en el proceso de purificación, ya que permite desacoplar los procesos de acumulación de biomasa y procesamiento y purificación a partir del tejido vegetal.

En el presente trabajo se describe el diseño y desarrollo de un sistema de producción de proteínas heterólogas en semillas de tabaco no comercial y se analizan tres ejemplos de interés farmacéutico y veterinario. El primer gen expresado y usado como modelo para validar este sistema fue el AgsHB, lo que permitió evaluar el funcionamiento de las señales de regulación para la expresión exclusiva en semillas, no detectándose la expresión en hojas de tabaco. El nivel de acumulación de este antígeno fue el más alto reportado hasta este momento en plantas. La caracterización estructural de la molécula producida en semillas confirmó el carácter particulado de este antígeno mediante estudios de sedimentación en sacarosa. Posteriormente, se produjo de forma activa el anticuerpo monoclonal CB.Hep-1, el cual fue purificado y caracterizado mediante análisis estructural y funcional. Los estudios de glicosilación mostraron diferencias en el funcionamiento de señales de anclaje en la vía secretora en semillas y hojas, aportando información útil para la futura expresión de otras moléculas en este sistema. Se seleccionaron líneas que mostraron los niveles de acumulación más altos reportados para un anticuerpo monoclonal en tabaco. Adicionalmente el anticuerpo de semillas mantuvo su capacidad de inmunopurificar el AgsHB, lo cual constituye su utilidad práctica. Finalmente la hemaglutinina del virus de influenza aviar (H5N1) se produjo con un elevado rendimiento y se estableció un protocolo de extracción muy sencillo. Se inmunizaron pollos con los extractos obtenidos y estos fueron capaces de generar una respuesta humoral capaz de inhibir la hemaglutinación de los eritrocitos, demostrando así su actividad antiviral. Estos resultados confirman que los anticuerpos y antígenos se acumulan en altos niveles en las semillas y son capaces de llevar a cabo la actividad para la cual fueron diseñados. El trabajo consolida la utilidad de las semillas de tabaco no comercial como biorreactor para la producción estable a altos niveles de proteínas de interés farmacéutico-veterinario y ofrece una tecnología de expresión para su explotación comercial.

Los resultados aparecen publicados en las revistas Transgenic Research y Biotecnología Aplicada y se presentaron en eventos nacionales e internacionales siendo objeto de reconocimiento por parte de importantes especialistas nacionales e internacionales.

Comunicación corta

Introducción

La revolución científica ocurrida en la biología en las últimas décadas propició el desarrollo de la ingeniería genética y de esta forma la transferencia de genes de una especie a otra. Las plantas constituyen un sistema muy versátil para la producción de proteínas recombinantes incluyendo productos farmacéuticos e industriales.

Entre las ventajas que ofrecen las plantas como biorreactor se encuentra el bajo costo del escalado de su biomasa comparado con la infraestructura industrial necesaria en otros sistemas de cultivos como el de microorganismos y células de mamíferos.

Además, las facilidades de su procesamiento y el bajo riesgo de contaminación por patógenos animales y humanos consolidan el interés en ellas de un amplio sector de investigadores y productores farmacéuticos. No obstante, hay que mencionar que los bajos niveles de expresión y acumulación en hojas ha sido una de las desventajas más importantes para la generalización de su aplicación.

En contraposición a las hojas, las semillas constituyen una plataforma alternativa idónea para la producción de proteínas en plantas ya que es el órgano natural de almacenamiento de proteínas y ofrece compartimentos subcelulares para este propósito con bajo contenido de proteasas. Adicionalmente, en ellas las proteínas de interés podrían ser conservadas por períodos prolongados a temperatura ambiente sin sufrir pérdidas de la actividad o integridad funcional.

A pesar que varios productos biológicos con aplicaciones clínicas son producidos de forma habitual en hojas de tabaco, las semillas no se han considerado como biorreactor aunque se ha documentado rendimientos de hasta 1.1 ton por hectárea en un año. Sin embargo, las semillas de tabaco se han estudiado como una plataforma productiva para biocombustibles o como fuente proteica para animales de granja. Teniendo en cuenta que el tabaco no es un cultivo comestible, los elementos regulatorios relacionados con la producción de proteínas recombinantes en semillas de este son menos rigurosos que en otros cultivos como el maíz, la soya o el arroz.

Adicionalmente existe tecnología disponible para la producción a gran escala de productos producidos en tabaco tanto por compañías extranjeras como en nuestro país.

La expresión recombinante del antígeno de superficie de la hepatitis B (AgsHB) constituye un ejemplo exitoso del uso de la tecnología del ADN recombinante para la producción de vacunas. En este sentido, se documentó su producción activa en células de mamíferos, diferentes especies de plantas y varias especies de levaduras, siendo las últimas las más extendidas desde el punto de vista comercial. El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) comercializa una vacuna preventiva contra el virus de la Hepatitis B basada en el AgsHB producido en la levadura *Pichia Pastoris* y ha desarrollado un poderoso sistema analítico para su seguimiento y control. Parte de este sistema lo constituye el anticuerpo monoclonal CB.Hep-1, el cual reconoce un epítopo lineal en el AgsHB y es usado tanto en el sistema analítico como en el proceso de producción del ingrediente farmacéutico activo de la vacuna. Este anticuerpo se produce en la actualidad en ascitis de ratón y en hojas de plantas de tabaco como alternativa, y en este último se obtienen bajos niveles de expresión del mismo. Por otra parte, los brotes de gripe aviar cepa H5N1 alertaron a la comunidad científica internacional, no solo por su elevada mortalidad sino por su potencialidad en la generación de una nueva pandemia. Por tal motivo, la hemaglutinina del virus de la influenza aviar (HA) se propuso como un blanco potencial para desarrollar vacunas contra esta enfermedad por la capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes a partir del sistema inmune del hospedero. Este antígeno se logró expresar de manera

transiente en *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana*, con niveles de acumulación inferiores a su demanda.

En la búsqueda de un sistema eficiente para la expresión de proteínas heterólogas en plantas, nos propusimos diseñar y construir un sistema de expresión estable en semillas de variedades no comerciales de *Nicotiana tabacum* L. La estrategia desarrollada incluyó el uso de potentes señales regulatorias que dirigen la expresión exclusiva a semillas de tres candidatos proteicos de interés farmacéutico-veterinario (AgsHB, AcM CB-Hep.1, HA), la evaluación y cuantificación de su expresión, el desarrollo de protocolos de purificación a partir del proteoma de semillas y la caracterización estructural y funcional de las proteínas recombinantes obtenidas.

Resultados y Discusión

Diseño y obtención de construcciones genéticas para la expresión de las proteínas en semillas de tabaco

Las unidades transcripcionales se diseñaron a partir de secuencias optimizadas para la producción de proteínas heterólogas bajo señales de regulación de semillas. Estas secuencias incluyeron el promotor Pphas de la proteína faseolina y la región 5' y 3' no codificante de la proteína arcelina, ambas provenientes de *Phaseolus vulgaris*, y los vectores de expresión se diseñaron buscando dirigir la acumulación de los genes en la vía secretora (las tres proteínas) y en el citosol (se utilizó en la expresión del AgsHB). Cuando se buscó retener la expresión de la proteína de interés en el Retículo endoplasmático, se incorporó la secuencia de aminoácidos KDEL en el extremo C-terminal de la proteína. Estos vectores fueron introducidos en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para la posterior transformación de tabaco. En el caso del anticuerpo monoclonal CB.Hep-1, se obtuvieron dos vectores independientes que contenían las cadena ligera y pesada, que fueron introducidos en *A. tumefaciens* y se cotransformaron explantes de tabaco con vistas a seleccionar plantas transformadas que contenían ambas cadenas (Hernández y cols, 2015).

Expresión tejido específica y niveles de expresión de las proteínas en semillas de tabaco

Los primeros estudios realizados por nuestro grupo con estas señales buscaron evaluar la expresión del AgsHB como proteína modelo para evaluar el sistema de semillas, teniendo en cuenta que es una molécula ampliamente estudiada en el CIGB. Se pudo comprobar la expresión exclusiva del mismo solo en las semillas, tanto a nivel de proteínas como de ARN, ya que solo fue posible detectar transcritos del antígeno en este tejido, confirmando que el promotor Pphas solo era activo en semillas (Figura 1A-B). El nivel de expresión obtenido del AgsHB (Tabla 1) fue de los más altos reportados para esta compleja proteína en plantas y se pudo detectar su expresión y acumulación en el citosol o en el retículo endoplasmático de las células (Hernández y cols., 2013).

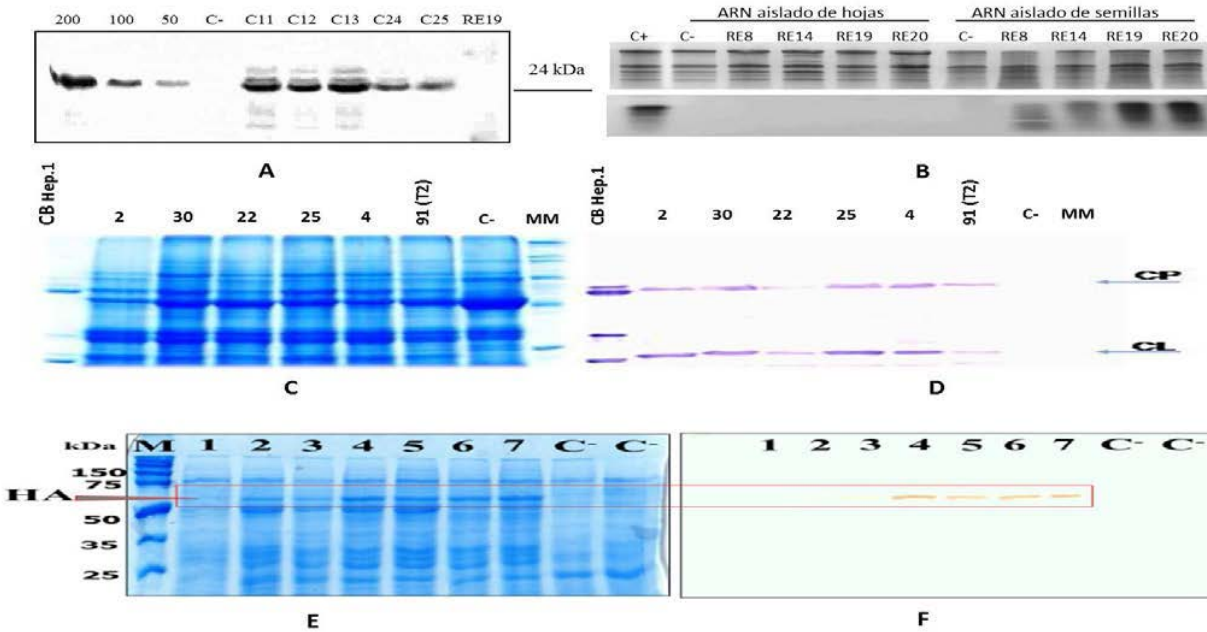


Figura 1: Análisis de expresión del AgsHB, AcM CBHep-1 y HA en semillas de tabaco. A: Análisis mediante western blot de varios clones (C11-25, RE19) que expresan el AgsHB. Como control negativo (C-) se usó semillas de tabaco no transformada. B: Análisis mediante northern blot de varios clones (RE8-20) que expresan el AgsHB en semillas y ausencia de expresión en hojas. Como control negativo (C-) se usó plantas de tabaco no transformado y control positivo plantas que expresan el AgsHB constitutivo. C-D: Análisis mediante SDS y western blot de expresión en varios clones que expresan el AcM CB.Hep-1, CL y CP: Cadenas ligera y pesada de AcM, C-: Extracto de semillas de tabaco no transformado, MM: Marcador de Peso de proteínas. E-F: Análisis mediante SDS y western blot de expresión en varios clones que expresan la HA de IA, HA: Talla esperada para la proteína HA, C-: Extracto de semillas de tabaco no transformado, M: Marcador de Peso de proteínas.

Una vez evaluada la expresión del AgsHB y la caracterización del modelo espacial para la expresión de los genes regulados por estas señales, se estudió la acumulación de otras proteínas de interés farmacéutico veterinario. Para ello se obtuvieron plantas de tabaco transformadas con construcciones para la expresión del Anticuerpo monoclonal CB. Hep-1 así como el antígeno Hemoaglutinina del virus de la influenza aviar H5N1. La expresión se caracterizó mediante SDS y western blot seleccionando aquellos clones con niveles de expresión más elevados (Figura 1C-F). Los mismos se cuantificaron mediante ELISA y aparecen reflejados en la Tabla 1.

Línea / Proteína expresada	Tipo de proteína/ Aplicación	Máxima expresión (mg/g semilla)
C13/ AgsHB	Antígeno/ Farmacéutico	0.0022
A91.20.25/ CB-Hep.1	Anticuerpo/ Farmacéutico	6.5
I13/ HA	Antígeno/ Veterinario	3.3

Tabla 1: Niveles de expresión del AgsHB, el AcM CB-Hep.1 y el antígeno HA de influenza aviar en semillas de tabaco no comercial.

En el caso del AcM CB.Hep-1, los niveles detectados son 100 veces superiores al evento registrado previamente para la producción de este anticuerpo a partir de hojas de tabaco. Otros anticuerpos monoclonales habían sido producidos en semillas de *Arabidopsis thaliana* con niveles de expresión en el mismo orden al descrito en este trabajo, pero en el caso de semillas de *Nicotiana tabacum* constituye la producción más alta de este tipo de molécula referida hasta el momento (Hernández y cols., 2015).

Los mejores clones que expresaron el antígeno HA de influenza aviar se seleccionaron y su expresión se cuantificó mediante ELISA usando una curva patrón de HA producida y purificada a partir de células humanas de carcinoma de cervix (SiHa). El nivel más alto de expresión fue de 3.3 mg de HA por gramo de semillas, correspondiente al clon I-13 (Tabla 1). Estos valores de expresión son 50 veces superiores a reportes previos de producción de este antígeno en sistemas que utilizan tejido foliar de *Nicotiana tabacum* y *Nicotiana benthamiana* como hospedero.

Caracterización estructural y funcional de las proteínas recombinantes producidas en semillas

✓ AgsHB

Varios reportes de la expresión del AgsHB en plantas refieren su ensamblaje en partículas similares a virus. De manera similar, se determinó el carácter particulado del AgsHB producido en semillas de tabaco mediante experimentos de sedimentación en gradientes de sacarosa (Figura 2a). El antígeno obtenido en semillas, tanto en el citosol como en RE, mostró una velocidad de sedimentación mayor que el AgsHB producido y purificado a partir de *Pichia. Pastoris*. Adicionalmente, las estructuras inmunoreactivas de alta densidad mostraron una mayor dispersión en el gradiente de sacarosa con respecto al AgsHB del microorganismo (Hernandez y cols., 2013). Estos resultados son consistentes con otros obtenidos en plantas y pudieran fundamentarse por un mayor tamaño y mayor variación de las partículas similares al virus de la hepatitis B obtenidas en las células vegetales, lo que no compromete su carácter inmunogénico.

✓ AcM CB.Hep-1

A partir de la selección de las líneas estables más productoras del anticuerpo en semillas, se montaron ensayos de purificación del mismo usando como cromatografía de captura la inmunoafinidad a Proteína A. La metodología de purificación del anticuerpo incluyó un paso de exclusión molecular con el objetivo de separar los fragmentos de degradación del anticuerpo. Los parámetros del proceso de purificación indicaron un porcentaje de pureza superior al 90% y un recobrado del 50% (Hernández y cols., 2015). El anticuerpo purificado mostró un patrón de glicosilación similar al obtenido previamente para proteínas producidas en semillas, donde hay mayor abundancia de azúcares complejos a pesar de contar con la señal KDEL de retención en RE (Hernández y cols., 2015) con respecto a la misma proteína producida en hojas. Para evaluar si el anticuerpo purificado a partir de semillas mantenía la capacidad de inmunopurificar el AgsHB, se realizó un ensayo a pequeña escala usando una matriz CL-4B con este anticuerpo acoplado. Como se muestra en la figura 2b la proteína purificada tiene un patrón de corrida electroforética muy similar al AgsHB estándar. Esto se comprobó además por un

ensayo Western blot demostrando así la capacidad del anticuerpo producido en semillas de inmunopurificar el AgsHB (Figura 2c).

✓ **HA**

La inmunogenicidad de HA producido en semillas fue determinada por la medición de los títulos de inhibición de la hemaglutinación (HI) en los sueros de los pollos inmunizados con extractos de semillas productoras de HA (Figura 2d). Esta es una técnica altamente sensible y específica debido a que únicamente mide aquellos anticuerpos dirigidos contra la HA viral. Los títulos de HI se definen según la EU/EMEA/CHMP (unión europea/agencia europea de medicamentos/comité para productos médicos humanos), como el recíproco de la dilución más alta que causa inhibición completa de la aglutinación de hematíes. La administración subcutánea de los animales se llevó a cabo con dos dosis de un extracto de semillas de tabaco del clon I-13 que contenía 20µg de HA, mezclado con el adyuvante M888. Se colectaron y evaluaron muestras de sangre semanalmente, excepto para la última extracción separada por quince días de la anterior. Los resultados de GMT de HI durante el curso del ensayo mostraron diferencia significativa en los títulos de anticuerpos detectados entre el tiempo T28 y T35 para $p < 0,05$, indicada con letras diferentes (figura 2d), relacionada con la respuesta de los pollos ante la segunda dosis del inmunógeno. El comportamiento en cuanto a significación estadística no fue observado para T35 y T49. Todos los sueros de los pollos inmunizados con extractos de semillas no transformadas, tomados como grupo control negativo, no evidenciaron respuesta humoral de HI en ninguno de los tiempos evaluados.

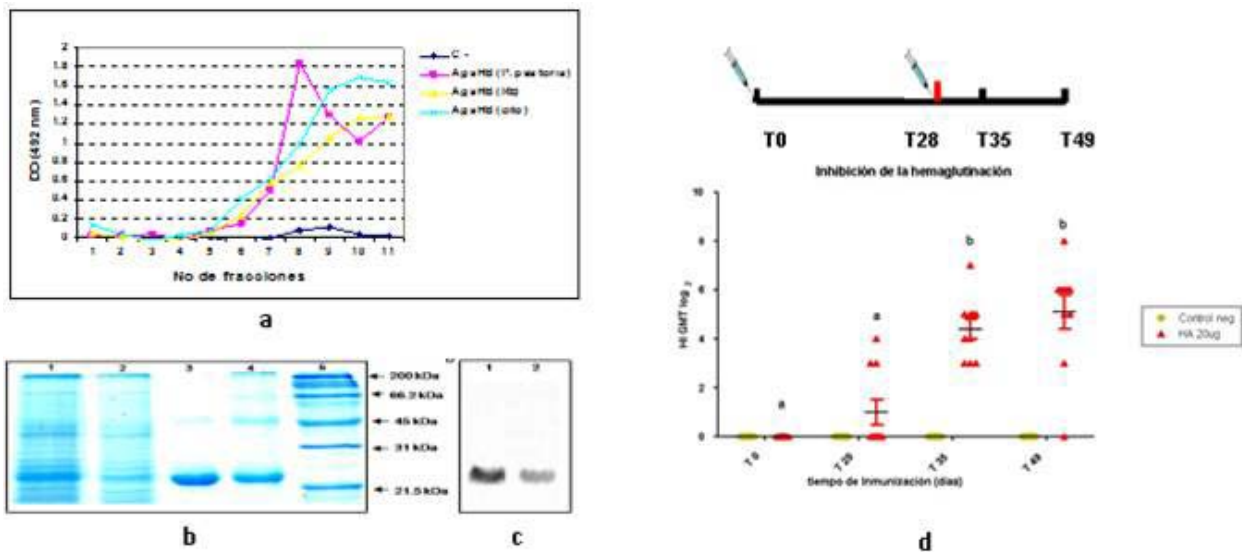


Figura 2: Análisis estructural y funcional de proteínas recombinantes obtenidas en semillas de tabaco. a: Evaluación de la sedimentación en gradiente discontinuo de sacarosa (5-50%) del AgsHB producido en semillas. Como control negativo se usó el extracto de semillas de tabaco no transformado y 10µg de AgsHB de *P. pastoris* constituyó el control positivo. Los gradientes se ultracentrifugaron a 30000 rpm por 7 h y se colectaron fracciones de 1mL. La fracción 1 es el tope del gradiente. b: Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE) con el resultado del proceso de purificación del AgsHB utilizando el anticuerpo CB.Hep-1 producido en semillas de tabaco. 1: muestra inicial (extracto de *P. pastoris*); 2: fracción no unida a la matriz; 3: fracción eluída con KSCN; 4: control positivo (AgsHB, ClGB); 5: patrón de peso molecular. c: Western blot con el resultado final del proceso de purificación del AgsHB con el anticuerpo CB.Hep-1 producido en semillas (carril 1) y el AgsHB purificado a partir de una matriz de inmunoafinidad

preparada con anticuerpo de origen murino (carril 2). d: Cinética de la respuesta de inhibición de la hemaglutinación en pollos inmunizados con HA producido en semillas. Los valores representan los títulos de medias geométricas (GMT) en base log₂. La producción de anticuerpos protectores se observaron después de la segunda inmunización. El grupo control inmunizado con extracto de semillas no transformadas no produjo anticuerpos anti-hemaglutinantes. Para el análisis de los datos se emplearon las pruebas estadísticas de Kruskal-Wallis y el test de Dunn para identificar los grupos cuyas medias diferían estadísticamente. Las letras diferentes indican diferencia significativa para $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos en este trabajo evidencian que es posible el uso de las semillas de tabaco como una alternativa de producción estable de proteínas de interés farmacéutico-veterinario. Los altos niveles de expresión alcanzados para las proteínas evaluadas, las facilidades para la conservación de la biomasa/semillas y para el procesamiento de la misma, así como la posibilidad de mantener las propiedades biológicas originales de cada una de los candidatos proteicos estudiados aquí, sugieren las semillas de tabaco como un biorreactor singular. Otros elementos relacionados con el incremento de la biomasa o el tiempo de producción de las semillas pudieran abordarse a través de técnicas de manejos de cultivos y serán abordados en investigaciones futuras.

Publicaciones

- ✓ Tobacco seeds as efficient production platform for a biologically active anti-HBsAg monoclonal antibody TRANSGENIC RESEARCH (2015) 24 (5), 897-909. DOI 10.1007/s11248-015-9890-8. Abel Hernández-Velázquez, Alina López-Quesada, Yanaysi Ceballo-Cámara, Gleysin Cabrera-Herrera, Kenia Tiel-González, Liliana Mirabal-Ortega, Marlene Pérez-Martínez, Rosabel Pérez-Castillo, Yamilka Rosabal-Ayán, Osmani Ramos-González, Gil Enríquez-Obregón, Ann Depicker, Merardo Pujol-Ferrer. Factor de Impacto: 2,2. Scopus, ISI Thomson.
- ✓ High-level production and aggregation of hepatitis B surface antigen in transgenic tobacco seeds. BIOTECNOLOGÍA APLICADA (2013) 30 (2). Abel Hernández, Alina López, Yanaysi Ceballo, Lissy Ayán, Yamilka Ayán, Kenia Tiel1, Marlene Pérez, Ernesto M González, Osmani Ramos, Gil Enríquez.