

Larvas de insecto autóctonas como plataforma para la producción de interferón beta recombinante para uso veterinario

Mariana B. Arregui¹; Alexandra M. Targovnik¹; Gregorio Mc Callum¹; Marcela Villaverde²; María V. Miranda¹.

¹*Instituto de Nanobiotecnología NANOBIOTEC (UBA-CONICET), Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.*

²*Unidad de Transferencia Genética, Instituto de Oncología “Dr. Ángel Roffo”. Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires.*

Correo electrónico: arreguimb@gmail.com.

Introducción

El interferón beta felino (fIFN β) pertenece a los interferones de tipo I, que son citoquinas secretadas por células en respuesta a infecciones virales, así como a otros microorganismos y sus componentes (oligosacáridos bacterianos, oligonucleótidos, material genético extraño, hongos). Es sabido que inducen un amplio rango de efectos: antivirales, antitumorales, antiparasitarios e inmunomoduladores. En veterinaria, la administración de interferones humanos recombinantes (hIFN α y hIFN β) conlleva un alto costo y además genera reacciones adversas. La mejor opción actualmente para reducir la mortalidad y los signos clínicos de ciertas infecciones virales, como la parvovirus canina, la leucemia felina viral o la inmunodeficiencia felina viral, es la administración de interferón omega felino (fIFN ω) que se comercializa en Europa (*Virbagen Omega*, *Virbac*). Dada la necesidad de contar con nuevos biofármacos para la industria veterinaria local, en este trabajo se desarrolló un método biotecnológico para la expresión y purificación de fIFN β recombinante, en el sistema baculovirus-larvas de insecto. Las larvas utilizadas resultan de particular interés como plataforma para la producción heteróloga de proteínas, ya que constituyen una plaga que afecta numerosos cultivos en nuestro país, resultando fáciles de conseguir y de bajo costo.

Materiales y métodos

El gen sintético de fIFN β contenido en el vector de clonado pUC18, se sub-clonó en el vector de transferencia pAcGP67-B. El fIFN β quedó clonado bajo el promotor de poliedrina y la secuencia señal viral gp67 que direcciona a la proteína al espacio extracelular.

Posteriormente se procedió a construir el baculovirus recombinante. Para ello, un cultivo de células *Sf9* en monocapa se co-transfectó con el vector de transferencia recombinante y el genoma linealizado del baculovirus *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus - AcNPV- (BaculoGold™, BD Biosciences), mediante liposomas. El BaculoGold™ porta dos características útiles: i) codifica para la *Green Fluorescent Protein* (GFP) como gen reportero, y ii) una delección letal que sólo es salvada mediante la recombinación homóloga, así todo virus presente en el sobrenadante de co-transfección es recombinante (AcNPV-IFN) y la purificación de virus es innecesaria.

Para generar un stock viral de alto título, el sobrenadante de co-transfección fue utilizado para tres rondas sucesivas de amplificación en *Sf9* en monocapa. Luego, se lo tituló por punto final.

Larvas de *Spodoptera frugiperda* en el quinto estadio (300 mg) fueron infectadas vía intrahemocele con AcNPV-IFN, y al quinto día post-infección (d.p.i) se cosecharon las larvas fluorescentes bajo luz UV y se mantuvieron a -20°C. El extracto larval se obtuvo por homogeneización de larvas congeladas en mortero, con buffer fosfato pH=7,0, centrifugación y descarte del pellet.

La purificación de la proteína de interés se realizó por cromatografía de pseudo-afinidad en matrices de *Blue-Sepharose*. Se sembró el extracto larval en buffer fosfato pH= 7,2, se realizaron lavados con [NaCl]= 0,5 M, y se eluyó la proteína con [NaCl]=1M, en el equipo ÄKTA Purifier (GE Healthcare).

Todo el proceso se analizó por SDS-PAGE 15% con tinción con *Coomasie-Blue*, o bien se realizó un Western Blot con anticuerpos específicos.

La actividad biológica del interferón beta felino recombinante (rfIFN β) purificado se ensayó *in vitro*. Por un lado, se expusieron células de carcinoma mamario felino a rfIFN β , y se cuantificó la disminución del número de células viables contra un control sin tratamiento (actividad antitumoral). Por otro lado, se desafió con el Virus de Estomatitis Vesicular (VSV) a fibroblastos de riñón de gato (*Crandell Reese Feline Kidney*, CRFK) pretratados el día anterior con rfIFN β en diluciones seriadas 1/2. La actividad antiviral se expresó como título, en unidades internacionales por mL (UI/mL) a partir de una curva de *Virbagen Omega*, de título conocido.

Además, en el producto purificado se analizó la presencia de DNA viral por PCR y geles de agarosa al 1%.

Resultados

La fluorescencia verde observada bajo luz UV de las células *Sf9* en cultivo evidenció que la co-transfección y recombinación homóloga habían sido exitosas. La proteína de interés se expresó correctamente bajo el promotor de poliedrina, y la secuencia señal gp67 la direccionó al espacio extracelular, haciéndola fácil de extraer luego de la homogeneización de las larvas enteras. Este resultado surge del revelado de *western blot* usando anticuerpos primarios específicos anti-rfIFN β .

La utilización de cromatografía de Blue-Sepharose permitió la purificación del rfIFN β en un solo paso, y en las condiciones del ensayo la mayoría de las proteínas contaminantes no se adsorbieron a la matriz. La presencia de rfIFN β en el eluido se evidenció por *western blot*, y la pureza del producto se comprobó por geles SDS-PAGE.

Finalmente, el rfIFN β purificado no presenta contaminación con proteínas inmunogénicas de la larva, según el ensayo de *western blot* con anticuerpos primarios anti-proteínas de larva *S. frugiperda*. Tampoco se detectó contaminación con DNA proveniente de baculovirus. Además, presentó una alta actividad biológica: actividad antiviral de 5×10^4 UFP/mL, comparable con la de *Virbagen Omega*, y actividad antitumoral superior a éste, disminuyendo la viabilidad celular más del 60%..

Conclusiones

Los resultados de este trabajo sientan las bases para el desarrollo de un proceso biotecnológico original basado en larvas de insecto, para la producción de un nuevo biofármaco para uso veterinario.