

**Fernando Bravo Almonacid**, Profesor de Biotecnología Vegetal, UNQ. Investigador Adjunto (INGEBI-UBA-CONICET),  
**Sonia Wirth**, bióloga, becaria doctoral CONICET, INGEBI-UBA-CONICET  
**María Eugenia Segretin**, bióloga, becaria doctoral CONICET, INGEBI-UBA-CONICET  
**Mauro Morgenfeld**, biólogo, becario doctoral ANPCyT, INGEBI-UBA-CONICET

# Las plantas como fábricas de proteínas terapéuticas

En los últimos años, la demanda y uso de péptidos y proteínas terapéuticos en la medicina humana y veterinaria han experimentado un marcado incremento. El mercado mundial de biofármacos para uso humano alcanza actualmente los 30.000 millones de dólares, y se estima que se duplicará para el año 2010. Más de 200 productos se encuentran en evaluación clínica, liderados por los anticuerpos monoclonales, de los cuales unos 70 se estarían comercializando en los próximos años. Sólo cuatro moléculas comprenden el 75% de la producción actual y, si las predicciones son correctas, la demanda podría superar la capacidad de manufactura, a menos que se desarrollen nuevos sistemas de producción.

Actualmente, la producción de biofármacos se realiza utilizando básicamente dos sistemas: microorganismos y cultivo de células de mamífero.

Respecto al primer sistema, existe la dificultad asociada a la incapacidad que tienen las bacterias y hongos de producir en las proteínas animales ciertas modificaciones que en la mayoría de los casos son indispensables para su funcionalidad, como por ejemplo, el agregado de determinados azúcares (glicosilación). Además, el plegado incorrecto de la proteína y la formación de agregados insolubles limitan la obtención de productos biológicamente activos o cuyo costo de purificación sea económicamente sostenible.

Los cultivos de células de mamífero, en cambio, tienen la ventaja de que permiten la síntesis de proteínas animales muy similares a la original. Sin embargo, la obtención y mantenimiento de las líneas celulares es un proceso largo y costoso que implica grandes inversiones adicionales cuando se pretende incrementar la escala de producción.

Estos sistemas requieren de personal técnico especializado y conllevan grandes riesgos económicos en caso de que ocurran contaminaciones en la línea de producción, aunque el contaminante no sea patogénico para la salud humana.

Todas las dificultades mencionadas han intensificado los esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas de producción de moléculas recombinantes seguras y a bajo costo.

En este entorno económico, la agricultura molecular, es decir, la utilización de animales o plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, constituye una alternativa posible a los sistemas de producción basados en microorganismos y cultivos de células.

## Las plantas como biorreactores

La producción de proteínas terapéuticas en animales transgénicos permite obtener productos muy similares a los sinte-

tizados en el organismo animal original, pero requiere de un tiempo de desarrollo muy largo y costoso. El aumento en la escala de producción es lento y se limita a los ciclos naturales de crecimiento de la especie utilizada. Además, existe el riesgo de contaminación con virus animales y priones. Es por ello que las ventajas asociadas a la producción de proteínas recombinantes en biorreactores vegetales han transformado a éstos en una opción altamente competitiva.

La principal ventaja de las plantas como sistemas de producción es la disponibilidad prácticamente ilimitada de biomasa que puede obtenerse utilizando la infraestructura ya existente para la siembra, cosecha, almacenamiento y procesamiento de los cultivos. El capital de inversión inicial y el costo para el aumento en la escala de producción son relativamente bajos. Más aún, el volumen de producción es extremadamente flexible y puede adaptarse rápidamente a las demandas del mercado incrementando o disminuyendo la superficie sembrada. Por otra parte, una vez establecido el cultivo, no se requiere de personal especializado, no hay riesgos de contaminación con patógenos animales, endotoxinas bacterianas o secuencias de ADN oncogénicas y puede aprovecharse el conocimiento previo de los sistemas de molienda y extracción en las primeras etapas del proceso de purificación. Una ventaja adicional es que las plantas permiten el almacenamiento estable de la proteína recombinante en semillas y tubérculos, facilitando su conservación, transporte y distribución. Más aún, los mecanismos de síntesis y modificaciones posteriores son los propios de las células de mamíferos, permitiendo la producción y ensamblado de proteínas multiméricas como los anticuerpos. Otro beneficio es que gozarían de una mayor aceptación pública que la utilización de animales transgénicos.

Cuando se comparan los costos de producción de proteínas recombinantes en distintos sistemas, se demuestra que —a menos que los niveles de proteína recombinante alcanzados sean excesivamente bajos— los costos de producción en plantas son generalmente inferiores a los de otros sistemas (ver recuadro).

Más del 85% del costo de producción de una proteína recombinante depende del proceso de purificación. Al respecto, las plantas poseen ventajas propias que permiten reducir estos valores, a través de la fabricación directa en tejidos comestibles o la acumulación en tubérculos o semillas. Las perspectivas de aumentar aún más los niveles de expresión (que se fabrique una mayor cantidad de la proteína de interés en los tejidos vegetales) y el desarrollo de técnicas más baratas de purificación, permitirán producir proteínas recombinantes a costos entre 10 y 100 veces inferiores a los de los fermentadores bacterianos.

Resumiendo lo expuesto, la producción económicamente rentable de proteínas recombinantes en plantas implica cumplir con tres requisitos primordiales: a) elevar los niveles de expresión, b) reducir los costos de purificación, y c) lograr un producto de características idénticas o similares al sintetizado en el sistema nativo.

### Proteínas expresadas en plantas: vacunas y otros ejemplos

Una de las aplicaciones más prometedoras de las plantas como biorreactores es su potencial uso para la producción de antígenos en tejidos comestibles (vacunas comestibles). La producción de proteínas antigénicas en los tejidos vegetales



permitiría protegerlas de la degradación en el tracto gastrointestinal, un factor crítico para desarrollar una vacuna oral exitosa. A su potencial bajo costo de producción, se suma la ventaja de su fácil distribución y administración. La expresión en tejidos de almacenamiento (en tubérculos, por ejemplo) en los que las proteínas son estables a temperatura ambiente, permitiría obviar la necesidad de establecer y mantener una cadena de frío, una de las limitaciones económicas más importantes para la distribución de las vacunas en muchas regiones geográficas del mundo. Sin embargo, no se puede obviar el principal desafío en la producción de una vacuna que todo sistema de producción debe enfrentar; esto es, que el antígeno debe conservar su integridad estructural y actividad funcional para inducir una respuesta inmune protectora. Es importante mencionar que, dada la necesidad de aplicar dosis controladas de los compuestos farmacológicos, se plantea la producción de cápsulas con tejido vegetal procesado en lugar del consumo de material vegetal fresco sin procesar.

Hasta la actualidad, se han expresado en plantas un número considerable de antígenos, que incluyen potenciales vacunas contra los agentes causales de diarreas, como los rotavirus, las cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, el *Vibrio cholerae* y el virus Norwalk, así como contra las infecciones producidas por los virus de la hepatitis B y C, HIV, virus respiratorio sincicial, virus del papiloma humano, virus de la rabia y el virus aftosa. También se ha reportado la expresión de antígenos para vacunas contra agentes patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bacillus anthracis* y el parásito responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum*, entre otros. Algunos de estos antígenos ya se evaluaron en ensayos clínicos en humanos, incluyendo la inmunización por ingestión de hojas de lechuga que contienen al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana

(HBsAg), tubérculos de papa que expresan la subunidad B de la toxina de *E. coli* enteropatógenas, o la cápside del virus Norwalk, y hojas de espinaca que protegen contra la rabia. En todos ellos se observó algún tipo de respuesta inmune, tanto sistémica como en mucosas, lo que alienta sobre la posibilidad de desarrollar vacunas orales contra éstos y otros patógenos humanos.

Otros ejemplos de proteínas terapéuticas expresadas exitosamente en plantas incluyen los anticuerpos que reconocen al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humano (HBsAg), a la glicoproteína B del virus del herpes simple humano de tipo 2, HSV-2, anticuerpos anti-esperma para su utilización como anticonceptivos, anti-idiotipos del linfoma no Hodgkins y un reactivo para diagnóstico del HIV. Dentro de esta clase de moléculas cabe destacar el caso de una IgA secretoria expresada en tabaco que reconoce un antígeno de *Streptococcus mutans*, el principal agente causal de la caries dental. En ensayos clínicos llevados a cabo en humanos, en los que se aplicó este anticuerpo en forma tópica luego del tratamiento con un antiséptico, se verificó una protección efectiva y específica contra la recolonización por *S. mutans* durante al menos cuatro meses ([www.planetbiotechnology.com](http://www.planetbiotechnology.com)).

Además de los antígenos y anticuerpos, existen diversos ejemplos de proteínas de uso farmacológico e industrial expresadas en tejidos vegetales. La producción de somatotropina humana (hST) en semillas de tabaco, la seroalbúmina humana (HSA) en papas, la aprotinina bovina en semillas de maíz, y el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (hGM-CSF) en semillas de tabaco son sólo algunos de ellos. Entre ellos podemos destacar la expresión en tabaco de la lipasa gástrica canina, utilizada para el tratamiento de insuficiencias pancreáticas y fibrosis quística, que se encuentra en la etapa de ensayos clínicos ([www.meristem-therapeutics.com](http://www.meristem-therapeutics.com)). Un ejemplo de desarrollo local en nuestro laboratorio es la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) en plantas de tabaco (ver recuadro aparte). El hEGF es un factor mitogénico que interviene en el desarrollo, diferenciación, reparación y protección de tejidos epiteliales. Se emplea para el tratamiento de heridas y quemaduras, como agente reparador en transplantes de córnea y para el tratamiento de úlceras gástricas y otras afecciones gastrointestinales.

Además de la expresión de proteínas terapéuticas, se están utilizando plantas como biorreactores para la producción de enzimas de uso industrial, como la avidina de pollo y la tripsina bovina producidas en semillas de maíz (ambas aprobadas para su comercialización, [www.prodigene.com](http://www.prodigene.com)); suplementos alimenticios como la fitasa del hongo *Aspergillus niger* en semillas de tabaco y colza, o polímeros como el colágeno, la seda de araña y plásticos biodegradables.

## Estrategias para la optimización de la producción

La optimización de los niveles de producción de la proteína recombinante puede lograrse siguiendo diversas estrategias. La elección de la misma o combinación de ellas dependerá de

las características de la proteína a sintetizar, de la especie vegetal utilizada y de las necesidades de producción. Generalmente, es difícil predecir cuál de estos aspectos tendrá mayor impacto para producir con éxito una proteína particular. Ello requiere, por lo tanto, ensayar múltiples variables para lograr niveles óptimos de producción. Los elementos a tener en cuenta son la elección del sistema de expresión y del germoplasma a transformar y el uso de herramientas moleculares para el diseño de las construcciones genéticas que contengan las secuencias de las proteínas a expresar.

En cuanto a la elección del sistema de expresión, las opciones comprenden dos grandes grupos: integrativos y no integrativos. El primer grupo se refiere a aquellos sistemas que permiten la integración estable de la construcción genética en el genoma vegetal, tanto en el núcleo como en las organelas. Resulta en una transformación estable y heredable, pero requiere etapas de cultivo de tejidos y métodos de transformación eficientes. La transformación de cloroplastos (organela característica de las células vegetales que contiene su propio genoma) ha resultado ser una alternativa muy interesante para la expresión de proteínas por numerosas ventajas, entre ellas, el gran número de cloroplastos por célula y el gran número de copias de su material genético dentro de cada cloroplasto, lo que permitiría alcanzar altos niveles de expresión. Más aun, al no transmitirse los cloroplastos al polen en la mayoría de las plantas, el riesgo de transmisión horizontal a especies relacionadas es nulo.

Los sistemas no integrativos, en cambio, no requieren de la integración del transgén, son más rápidos, pero no son heredables a la progenie. En este último grupo se encuentran la transformación transitoria con vectores virales y por agroinfiltración.

Otros factores a tener en cuenta a la hora de decidir una estrategia para la producción de proteínas en plantas incluyen la elección de la especie vegetal, así como también en qué parte u órgano de la planta ha de expresarse dicha proteína (hojas, tubérculos, semillas, raíces, suspensiones celulares) para obtener mayor estabilidad y/o mejores condiciones para su almacenamiento, etc.

Por último, y no menos importante, existen muchas herramientas moleculares que permiten optimizar el sistema, e incluyen la elección de elementos genéticos reguladores para expresar la proteína en tejidos vegetales específicos, la fusión a otras proteínas y la localización de la proteína en distintos compartimentos intracelulares para aumentar su estabilidad y/o facilitar su purificación. Se ha demostrado que es posible dirigir la proteína recombinante al espacio intercelular (apoplasto), lo que permite su secreción a través de las raíces (rizosecreción). Se puede purificar entonces la proteína recombinante del medio que rodea las raíces de las plantas transgénicas que crecen en un sistema hidropónico.

De todo lo expuesto se desprende que las plantas se presentan como un sistema con numerosas ventajas frente a los otros disponibles para la producción de proteínas recombinantes de aplicación terapéutica o industrial. Aunque para cada proteína en particular se deban evaluar distintas alternativas hasta encontrar aquella en la que los niveles de expresión sean óptimos, es de esperar que a corto plazo la utilización de



las plantas como biorreactores sea la opción más atractiva.

Los trabajos realizados en el laboratorio fueron financiados por los siguientes subsidios:

Proyecto PICT 2000 N° 08-03529, ANPCyT y Proyecto BID 802/OC-AR PICT 00 n° 08-08702.

### Lectura recomendada

Chadd H., y Chamow S. (2001). Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:188-194.

Daniell, H., Streatfield, S. y Wycoff, K. (2001 a). Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 219-226.

Fischer, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. y Twyman R. (2004). Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:152-158.

Giddings, G (2001). Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 450-454.

Kusnadi, A., Nikolov, Z. y Howard, J. (1997). Production of recombinant proteins in transgenic plants: practical considerations. *Biotechnology and Bioengineering*, 56: 473-484.

Larrick, J. y Thomas, D. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 411-418.

Ma J., Drake P., y Christou P., (2003). The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4: 794-805.

Maliga P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:289-313.

Mason, H., Warzecha, H., Mor, T. y Arntzen, C (2002). Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends in Molecular Medicine*, 8: 324-329.

Mor, T., Gomez-Lim, M. y Palmer, K. (1998). Perspective: edible vaccines a concept coming of age. *Trends in Microbiology*, 6: 449-453.

Peterson, R., y Arntzen C. (2004) On risk and plant-based biopharmaceuticals *Trends in Biotechnology*, 22: 64-66.

Sala, F., Rigano, M., Barbante, A., Basso, B., Walmsley, A. y Castiglione, S (2003). Vaccine antigen production in transgenic plants: strategies, gene constructs and perspectives. *Vaccine*, 21: 803-808.

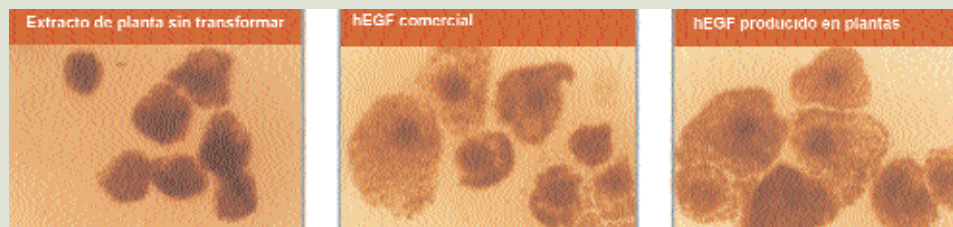
Smith, M. y Glick, B. (2000). The Production of antibodies in plants: An idea whose time has come? *Biotechnology Advances*, 18: 85-89.

Twyman, R., Stoger, E., Schillberg, S., Christou, P. y Fischer, R (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21: 570-578.

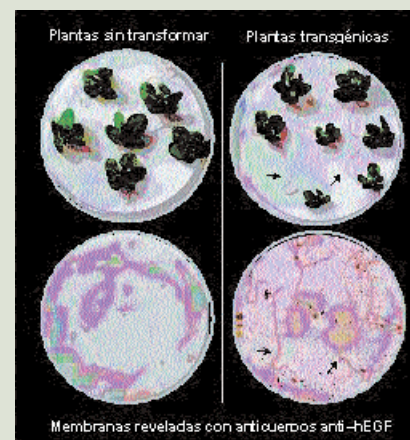
Wirth S., Calamante G., Mentaberry A., Bussmann L., Lattanzi M., Barañao L. y Bravo-Almonacid F. (2004) Expression of active epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. *Mol. Breeding*, 13: 23-35.

Wirth S. (2005) Desarrollo de sistemas de expresión integrativos y no integrativos para la producción de biofármacos en plantas de tabaco. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

## Expresión de Factor de Crecimiento Epidérmico humano (hEGF) en plantas de tabaco

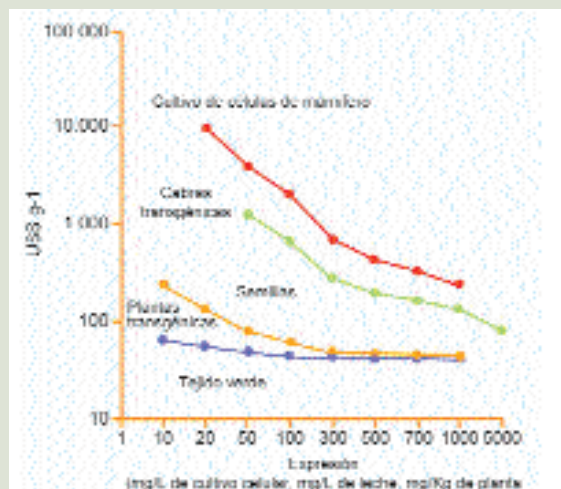


En el laboratorio se desarrolló un proyecto para la expresión de factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) en plantas de tabaco. Se evaluaron distintos sistemas de expresión integrativos (transformación nuclear y de cloroplastos) y no integrativos. Para corroborar que el hEGF producido en plantas era igual funcionalmente al comercial, ensayamos si era capaz de inducir el efecto típico de esta proteína: la expansión de células del cumulus de ovocitos bovinos. El medio de la maduración de los ovocitos se suplementó con extracto de una planta sin transformar, con hEGF comercial, o con extractos de una planta de tabaco transformada a nivel nuclear con el gen de hEGF. Con éste y otros resultados pudimos concluir que el hEGF producido en tabaco se comporta igual que el comercial. Además, observamos que las plantas de tabaco que fabrican hEGF lo secretan a través de sus raíces, lo que facilitaría su purificación. La proteína hEGF puede detectarse con un anticuerpo marcado donde crecieron las raíces de las plantas transgénicas (flechas), pero no donde crecieron las raíces de las plantas sin transformar.



Tomado de Wirth y col., *Mol. Breeding*, 2004

## Comparación de costos para distintos sistemas de producción de proteínas



Estimación de los costos de producción en función del nivel de expresión de IgA en distintos sistemas y asumiendo que los costos de purificación y las pérdidas que ocurren durante este proceso son iguales en todos los casos.

Tomado de Daniell et. al. *Trends in Plant Sci.*, 2001.