

DESARROLLO DE UN PROCESO DE PRODUCCIÓN DE UN BIOLÓGICO VETERINARIO CON ACTIVIDAD FOLÍCULO-ESTIMULANTE

Villaraza, Carlos^{1,2}

¹Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico. Centro Biotecnológico del Litoral. FBCB-UNL.
²CONICET

Directora: Ceaglio, Natalia
Codirector: Prieto, Claudio

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Gonadotropina Coriónica Equina Recombinante, PMSG, Cultivos celulares

INTRODUCCIÓN

La gonadotropina coriónica equina (eCG) es un miembro de la familia de hormonas glicoproteicas junto con la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo-estimulante (FSH) y la hormona estimulante de tiroides (TSH) (Murphy y Martinuk, 1991). En especies diferentes a la equina, la eCG muestra una elevada actividad FSH y LH (Combarous y col., 1984) y, por otra parte, posee una vida media en circulación muy prolongada. Debido a ambas características, la eCG se utiliza en medicina veterinaria para controlar la actividad reproductiva en diferentes tipos de ganado (Murphy, 2012; De Rensis y col., 2014; Bó y col., 2016). Hasta hace un tiempo, el único producto comercial disponible para este fin consistía en una preparación parcialmente purificada de plasma de yeguas preñadas (PMSG), que no solo constituía un riesgo para la salud por los posibles contaminantes presentes en el plasma, sino que también planteaba algunas cuestiones bioéticas. Se han descrito diversos intentos para producir la eCG recombinante (reCG) en diferentes huéspedes (Legardinier y col., 2005; Jablonka-Shariff y col., 2007; Ubach, 2009; Ingles, 2012). No obstante, en todos los casos, la hormona no mostró bioactividad *in vivo* significativa en modelos de rata, o fue producida en cantidades insuficientes para fines comerciales.

OBJETIVOS

El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un proceso de producción de la reCG mediante la expresión de la proteína a partir del cultivo de células animales modificadas por ingeniería genética, utilizando medio de cultivo libre de suero fetal bovino (SFM).

METODOLOGÍA

Construcción de vectores plasmídicos y ensamblado de partículas lentivirales

La secuencia sintética codificante de reCG (reCG α y reCG β) optimizada para su expresión en células CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) fue solicitada a la empresa GENEART.

Título del proyecto: "Plataforma biotecnológica para la producción de hormonas recombinantes de interés en sanidad animal. Instrumento: CAI+D 2020. 50620190100071LI Año convocatoria: 2020 Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral Director: Dr. Claudio Prieto
--

La secuencia codificante de cada una de las subunidades de reCG fue clonada en el vector de transferencia lentiviral pEF-1 α , el cual contiene el promotor EF-1 α dirigiendo la expresión de la secuencia de interés. Se generaron dos vectores de transferencia: pEF-1 α -reCG α y pEF-1 α -reCG β .

Las partículas lentivirales (PLs) fueron generadas mediante transfección de células HEK 293T/17 en adherencia con 4 plásmidos: pREV; pVSVG; pMDL y el respectivo vector de transferencia pEF-1 α -reCG α o pEF-1 α -reCG β . Para tal fin, se utilizaron como *carrier* lípidos catiónicos. Los sobrenadantes conteniendo los vectores lentivirales se cosecharon a las 48 h post-transfección, se centrifugaron a 65.000 *g*, se resuspendieron en medio libre de suero fetal bovino (SFM) y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Generación de líneas y clones celulares productores de reCG

Para la generación de líneas celulares productoras de reCG se realizaron dos transducciones sucesivas de la línea celular CHO-K1 adaptada a crecimiento en suspensión (sCHO-K1) con cada una de las PLs ensambladas. Las líneas celulares generadas fueron sometidas a presión de selección con el antibiótico puromicina para eliminar aquellas células no transducidas.

Con el objetivo de obtener clones celulares productores de reCG, se realizó el clonado de la línea celular generada mediante la técnica de dilución límite. Se analizaron un total de 400 clones mediante técnica de *dot blot* en tres rondas de preselección. Los clones seleccionados después de cada ronda se subcultivaron y reevaluaron en una nueva ronda de selección hasta que pudieron identificarse cinco clones de mayor producción.

Cultivo en biorreactor y purificación

El clon celular con mejores características de crecimiento y productividad se cultivó en un biorreactor de 1 L (BIOSTAT® Qplus, Sartorius) en modo continuo con perfusión durante 19 días. Los parámetros de cultivo fueron controlados de forma *on-line*. Se tomaron muestras diarias para determinar la densidad celular, la viabilidad, los niveles de glucosa y lactato y la concentración de reCG.

El sobrenadante de cultivo conteniendo reCG se sembró en una columna XK 16/20 (GE Healthcare) empaquetada con resina CaptoBlue Sepharose FF previamente equilibrada con *buffer* Tris pH 7, conectada a un equipo ÄKTA purifier 100 Air (GE Healthcare). La columna se lavó con *buffer* de equilibrado y la reCG se eluyó de la columna con *buffer* NET (NaCl, Etanol, Tris). El eluato se concentró y diafiltró contra PBS utilizando dispositivos Microsep® (PALL corporation).

Caracterización fisicoquímica y cuantificación de reCG

La concentración de reCG en los sobrenadantes de cultivo se evaluó mediante ELISA de competición. Por otro lado, la molécula producida fue caracterizada empleando ensayos de SDS-PAGE e isoelectroenfoque seguidos de *western blot* en comparación con un lote de PMSG comercial.

Evaluación de la actividad *in vivo* de la reCG

La potencia biológica *in vivo* de la reCG parcialmente purificada se evaluó en ratas hembras mediante el ensayo descrito por Steelman y Pohley. El mismo fue llevado a cabo en el ICIVET-CMC (FCV-UNL). Por otro lado, se evaluó la eficacia de diferentes dosis de reCG en un protocolo de inseminación artificial a tiempo fijo (IATF) sobre la tasa de preñez en animales de destino. Para ello, 82 vacas *Bos indicus* x *Bos taurus* en anestro fueron distribuidas en cuatro grupos, los cuales recibieron 100 (n=21), 140 (n= 20) y 200 (n=20) UI

de reCG o 400 UI de PMSG (n= 21). El diagnóstico de preñez se realizó mediante ultrasonografía a los 30 días post-IATF.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se construyeron dos vectores de expresión lentivirales codificantes de las subunidades α y β de la eCG a partir de los cuales se generaron dos líneas celulares productoras de la hormona, denominadas sCHO reCG Td1 y Td2. La productividad específica de la línea Td2 fue casi 4 veces superior a la de la línea Td1 ($5,6 \pm 0,2 \text{ UI} \cdot 10^6 \text{ cel}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para la Td1 y $22 \pm 1 \text{ UI} \cdot 10^6 \text{ cel}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para la Td2, $p < 0,05$). Teniendo en cuenta estos resultados, se seleccionó la línea Td2 para ser clonada mediante la técnica de dilución límite, a partir de la cual se obtuvieron dos clones celulares con un nivel de expresión similar a la línea parental ($20,6 \pm 0,4 \text{ UI} \cdot 10^6 \text{ cel}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para el clon P5C3 y $17,5 \pm 0,5 \text{ UI} \cdot 10^6 \text{ cel}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ para el P5D9, $p < 0,05$).

Debido a su mayor productividad, el clon P5C3 fue seleccionado para su cultivo en biorreactor de 1 L, cultivado en modo perfusión en SFM durante 19 días. El cultivo alcanzó una densidad celular máxima de $2,9 \times 10^7 \text{ cél}^{-1} \cdot \text{mL}^{-1}$. Los niveles de lactato se mantuvieron siempre por debajo de 15 mM. El clon P5C3 presentó una velocidad específica de crecimiento de $0,013 \text{ h}^{-1}$, con una producción cercana a $1,8 \times 10^5 \text{ UI}$ de reCG por día. La reCG fue parcialmente purificada a partir del sobrenadante de cultivo mediante cromatografía de pseudoafinidad a colorantes, empleando la resina CaptoBlue-Sepharose FF, obteniéndose una recuperación de aproximadamente 70%.

Para determinar la masa molecular aparente de la hormona recombinante, la reCG parcialmente purificada fue evaluada mediante SDS-PAGE seguido de *western blot* y comparada con un lote de PMSG comercial y con un sobrenadante de sCHO sin modificar (sCHOwt) (Fig. 1). La masa molecular aparente del heterodímero de reCG fue de aproximadamente 46 kDa con bandas en el intervalo de 40 a 52 kDa (Fig. 1A, carril 2). También se detectaron trazas de subunidad α libre, con una masa molecular aparente de 21 a 28 kDa. Cuando se calentaron las muestras, el dímero de reCG se disoció en cada una de sus subunidades (Fig. 1B, carril 2). Esto se evidenció por la desaparición de la banda alrededor de 46 kDa, la aparición de una nueva banda correspondiente a la subunidad β de alrededor de 29-37 kDa, y el consecuente aumento en la intensidad de la banda correspondiente a la subunidad α . Por otro lado, la PMSG exhibió un perfil electroforético muy diferente, con una mayor heterogeneidad dada por la presencia de numerosas bandas de masas moleculares entre 50 y 72 kDa, y algunas bandas de masas moleculares superiores a 100 kDa (Fig. 1A, carril 1). Cuando las muestras se sometieron a condiciones reductoras, el anticuerpo no pudo detectar reCG ni PMSG (Fig. 1C, carriles 1 y 2).

Con el objetivo de comparar el perfil de isoformas de la reCG parcialmente purificada y de la PMSG, se realizó un ensayo de IEF seguido de *western blot* (Fig. 2). La PMSG exhibió un mayor número de isoformas que la reCG, distribuidas prácticamente en todo el rango de pH, con predominio de isoformas más ácidas, probablemente debido a un mayor contenido de residuos de ácido siálico. La reCG parcialmente purificada evidenció un menor número de isoformas, ubicadas en el rango menos ácido del gel, es decir, con un punto isoeléctrico (pI) mayor con respecto a la PMSG, lo cual indicaría un menor grado de sialidación. Esto se encuentra en concordancia con la menor masa molecular observada en los ensayos de SDS-PAGE, que estaría indicando un menor grado de glicosilación de la hormona recombinante con respecto a la PMSG.

La potencia *in vivo* en ratas de la reCG parcialmente purificada demostró un valor de $7200 \pm 100 \text{ UI} \cdot \text{ml}^{-1}$, lo cual permitió corroborar la actividad biológica de la hormona producida en animales de experimentación.

Finalmente, se evaluó la eficacia de diferentes dosis de reCG en un protocolo IATF sobre la tasa de preñez en animales de destino. Las tasas de preñez obtenidas fueron 33,3% (7/21), 45,0% (9/20) y 30,0% (6/20) para las vacas que recibieron 100, 140 y 200 UI de reCG, respectivamente, y 42,9% (9/21) para aquellas que recibieron 400 UI de PMSG.

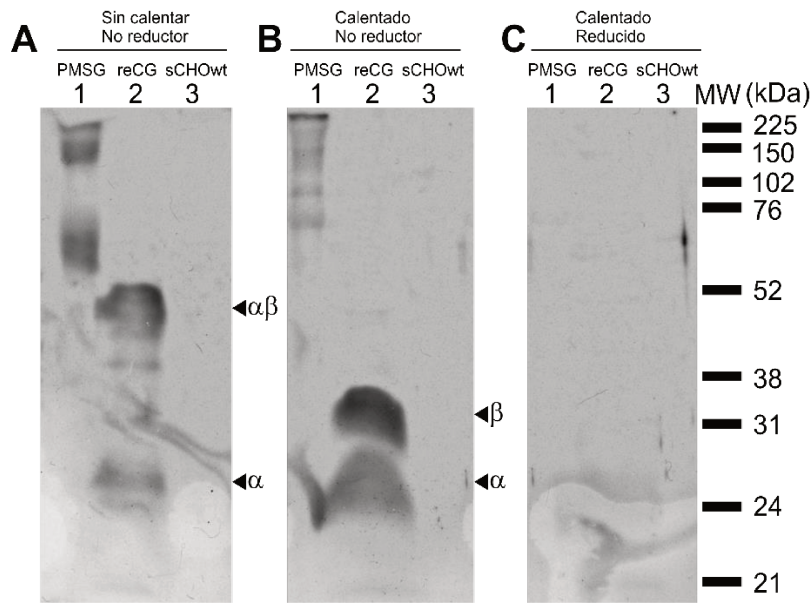


Figura 2. SDS-PAGE seguido de *western blot* de reCG y PMSG en diferentes condiciones. **A:** Muestras sin calentar en condiciones no reductoras. **B:** Muestras calentadas en condiciones no reductoras. **C:** Muestras calentadas en condiciones reductoras. Para cada panel, el carril 1 corresponde a PMSG, el carril 2 a reCG, el carril 3 al sobrenadante de sCHOwt y el carril MW al marcador ECLTM RainbowTM (AmershamTM).

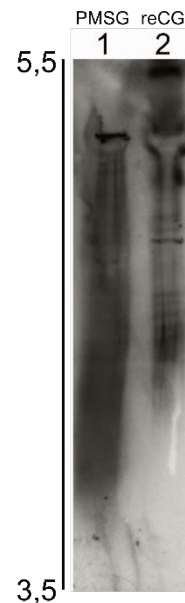


Figura 1. Perfil de glicofomas de la PMSG (carril 1) y reCG (carril 2) en un ensayo de IEF seguido de *western blot*. La línea indica el rango de pH empleado.

CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran que la estrategia desarrollada representa una opción atractiva para la producción de reCG y constituye una alternativa auspiciosa para el reemplazo de animales como fuente de PMSG.

BIBLIOGRAFÍA

- Bó G., de la Mata J., Baruselli P., Mechaca A.** 2016. Alternative programs for synchronizing and resynchronizing ovulation in beef cattle. *Theriogenology* 86, 388-396
- Combarnous Y. y Martinat N.** 1984. Comparison of in Vitro Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Activity of Equine Gonadotropins (Luteinizing Hormone, FSH, and Chorionic Gonadotropin) in Male and Female Rats. *Endocrinology* 115, 1821-1827.
- De Rensis F. y López-Gatius F.** 2014. Use of equine chorionic gonadotropin to control reproduction of the dairy cow: A review. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 177-184.
- Font Inglès A.**, 2012. Development of the production process for a recombinant hormone and evaluation of its biological activity. PhD Thesis.
- Jablonka-Shariff A., Roser J., Bousfield G., Wolfe M., Sibley L., Colgin M, y Boime I.** 2007. Expression and bioactivity of a single chain recombinant equine luteinizing hormone (reLH). *Theriogenology* 67, 311-320.
- Legardinier S., Duonor-Cérutti M., Devauchelle G., Combarnous Y. y Cahoreau C.** 2005. Biological activities of recombinant equine luteinizing hormone/chorionic gonadotropin (eLH/CG) expressed in Sf9 and Mimic insect cell lines. *J. Mol. Endocrinol.* 34, 47-60.
- Murphy B.** 2012. Equine chorionic gonadotropin: an enigmatic but essential tool. *Anim. Reprod.* 9, 223-230.
- Murphy B. y Martinuk S.** 1991. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr. Rev.* 12, 27-44.
- Steelman S. y Polhey F.** 1953. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 53, 604-616
- Ubach A.** 2009. Producció recombinant de la gonadotrofina corionica equina amb el llevat *Pichia pastoris*. PhD Thesis.