

# Production of recombinant Immunoglobulin A in plants for passive immunotherapy.

Paloma Juárez Ortega

## Resumen en Castellano

La inmunización pasiva de las mucosas se define como la transferencia de anticuerpos activos de un organismo a las superficies de las mucosas de otro para la prevención o tratamiento de enfermedades infecciosas. La inmunización pasiva de las mucosas tiene un gran potencial en la prevención y tratamiento de infecciones gastrointestinales como las causadas por rotavirus, con más de 114 millones de episodios de diarrea y más de 450.000 muertes al año. Sin embargo, el elevado coste de los anticuerpos recombinantes que actualmente se producen en células de mamífero, frena la producción de las grandes cantidades de anticuerpos requeridas para estrategias de inmunización pasiva. Las plantas, como plataformas de expresión alternativas, podrían facilitar el escalado y la reducción de costes. Además, el empleo de órganos comestibles, que están catalogados como *Generalmente-Reconocidos-Como-Seguros* (GRAS), podría suponer una reducción adicional de los costes al disminuir los requerimientos de purificación de los anticuerpos. En el presente trabajo se analiza la viabilidad de la utilización de los frutos como biofactorías de anticuerpos humanos, que pueden ser administrados oralmente como extractos crudos o bien como formulaciones parcialmente purificadas en estrategias de inmunización pasiva de las mucosas.

En la primera sección de esta tesis se describe la generación de plantas de tomate que producen en sus frutos una inmunoglobulina A (IgA) modelo frente a rotavirus. Como resultado de este trabajo, se obtuvo una línea élite homocigota cuyos frutos producían un promedio de 41  $\mu\text{g}$  de IgA por gramo de peso fresco, equivalente a 0,69 mg de IgA por gramo de polvo de tomate seco. Ciertas formulaciones parcialmente purificadas, derivadas de tomates con IgA, fueron capaces de inhibir fuertemente la infección viral en un ensayo de neutralización *in vitro*. Además, con el propósito de poder distinguir los tomates transgénicos con IgA de los tomates silvestres, los tomates con IgA se cruzaron con una línea de tomate

transgénico que expresaba los genes de *Antirrhinum majus* que codifican los factores de transcripción Rosea1 y Delila. Estos factores de transcripción confieren al fruto un intenso color morado. El tomate morado resultante no solo presenta elevados niveles de IgA humana neutralizante sino también altos niveles de antocianinas.

En la segunda sección de esta tesis, la composición de los tomates con IgA fue analizada en busca de posibles efectos no intencionados que pudieran comprometer el estatus GRAS del producto final. Los tomates transgénicos con IgA fueron comparados con tomates silvestres y también con variedades comerciales utilizando técnicas de proteómica y metabolómica. Mediante geles 2D-DIGE y LC-MSMS para la identificación de proteínas se demostró que todas las proteínas diferenciales que aumentaban sus niveles en las líneas transgénicas correspondían únicamente a cadenas o fragmentos de inmunoglobulinas. Además, un análisis no dirigido mediante UPLC-MS permitió identificar variaciones entre líneas transgénicas y no transgénicas; sin embargo, esas variaciones no se pudieron asociar a la presencia de niveles anormales de ningún metabolito secundario en particular en los frutos con IgA. Por lo tanto, de este análisis no se pudo deducir que las formulaciones a partir de tomates con IgA fueran menos seguras para el consumo que sus correspondientes formulaciones con tomates silvestres.

La tercera sección de esta tesis se centró en la optimización de la producción de la forma secretora de la IgA (sIgA), ya que es el isotipo de anticuerpo más conveniente para la inmunización pasiva de las mucosas. La producción de sIgA requiere la co-expresión de cuatro unidades transcripcionales que codifican la cadena ligera (LC), la cadena pesada (HC), la cadena J (JC) y el componente secretor (SC). Para optimizar esta producción, se construyeron dieciséis versiones de una sIgA humana frente a rotavirus utilizando el sistema de ensamblaje multigénico GoldenBraid. Estas 16 versiones consistían en diferentes combinaciones de cadenas de anticuerpo, incorporando algunas de ellas una señal de retención en el retículo endoplasmático (KDEL). Mediante expresión transitoria en *Nicotiana benthamiana* de todas las versiones de sIgA se observó que se obtenían niveles máximos de expresión con la versión de sIgA que contenía la cadena pesada tipo alfa1, la cadena ligera tipo lambda y una señal KDEL unida al componente secretor. La forma secretora representó solo el 33% del total de la IgA acumulada.