

EXPRESIÓN DEL FACTOR VIII HUMANO RECOMBINANTE EN LA LEVADURA *PICHIA PASTORIS*

L. Martorell¹, L. Ramírez¹, R. Parra^{1,2}, F. Vidal¹

¹Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular. Banc de Sang i Teixits. Barcelona.

²Unitat d'Hemofília de l'Hospital General Vall d'Hebron. Barcelona

Introducción: Para la producción industrial de Factor VIII humano recombinante (rhFVIII) se emplean sistemas de expresión heteróloga complejos como las células de mamífero. Estos sistemas son idóneos ya que permiten el correcto plegamiento, secreción y patrón de glicosilación del rhFVIII. Sin embargo, son sistemas caros y ello incide de manera significativa en el elevado coste de la terapia de sustitución recombinante en Hemofilia A.

Objetivo: El objetivo de nuestro trabajo consiste en explorar la expresión funcional del rhFVIII en la levadura *Pichia pastoris*, que se ha revelado como un sistema de producción eficaz y económico.

Métodos: Con este fin, se empleó la secuencia codificante de una variante del FVIII humano con el dominio B delecionado (hFVIII-BDD), así como dicha secuencia optimizada en base a la utilización de codones preferentes para la expresión en *P. pastoris* (Ye-hFVIII-BDD). Éstas se clonaron en los vectores de expresión de forma que el rhFVIII se secretara al medio de cultivo, mediante el péptido de secreción endógeno del hFVIII o del factor alfa de *Sacharomices cerevisiae*. Posteriormente se transfectaron en *P. pastoris* por electroporación, permitiendo incorporar un número elevado de copias del gen por recombinaciones sucesivas con el material genético de la célula huésped. Las líneas productoras se seleccionaron por la resistencia a antibiótico y por el número de copias del gen integradas. La capacidad de producción se estudio en base a los niveles de mRNA y de proteína de FVIII alcanzados, así como a la actividad coagulante presente en el medio de cultivo.

Resultados: Bajo estas condiciones se observó que las variantes Ye-hFVIII-BDD permiten alcanzar mayores niveles de mRNA y su estabilización durante la fase de producción. Además, el péptido de secreción endógeno del hFVIII es por sí mismo capaz de exportar la proteína al medio de cultivo, incluso en mayor medida que el péptido señal del factor alfa de levadura. De esta forma, diferentes cepas fueron capaces de acumular niveles de antígeno de rhFVIII detectables por Western Blot. Finalmente, la actividad coagulante de las variantes producidas alcanzaron valores próximos al 1-2% de los niveles presentes en un plasma control.

Conclusión: En base a estos resultados, la levadura *P. pastoris* resulta ser un sistema viable para la producción de rhFVIII comparable, respecto a los niveles de producción, a sistemas de células de mamífero. Sin embargo, una mayor optimización del procedimiento permitirá conseguir mayores niveles de producción y actividad.