

LARVAS DE INSECTOS: UNA NUEVA PLATAFORMA PARA PRODUCIR PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE INTERÉS COMERCIAL

Alexandra M. Targovnik, Mariana B. Arregui, Gregorio J. Mc Callum, Ignacio Smith, Lautaro F. Bracco, Agustín A. Navarro del Cañizo, Federico J. Wolman, Osvaldo Cascone y María V. Miranda (*)

Instituto de Nanobiotecnología (NANOBIOTEC, UBA-CONICET). Cátedra de Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Junín 956, 1113, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

* E-mail: mvic@ffyba.uba.ar

RESUMEN	45
SUMMARY	46
INTRODUCCIÓN	46
EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS: GENERALIDADES Y CONSTRUCCIÓN	47
ESPECIES DE LARVAS DE INSECTOS Y SU SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN CON BACULOVIRUS	48
OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA EN LARVAS	49
LARVAS TRANSGÉNICAS PARA MODIFICAR EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DE INSECTOS	50
EL SISTEMA DE BACULOVIRUS EN LARVAS DE INSECTO COMO UNA PLATAFORMA ALTERNATIVA PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FARMACÉUTICAS	50
EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	53
CONCLUSIÓN	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
Agradecimientos	58

RESUMEN

En Biotecnología, la expresión de proteínas recombinantes es un campo en constante crecimiento y para el cual se utilizan diferentes huéspedes. Como algunas proteínas valiosas no se pueden producir utilizando los sistemas tradicionales, los insectos del orden Lepidoptera infectados con baculovirus recombinantes han surgido como una interesante alternativa para expresar altos niveles de proteínas, especialmente aquellas con modificaciones postraduccionales. Los insectos lepidópteros, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en el mundo, pueden utilizarse como pequeñas fábricas de proteínas, llamadas las nuevas “biofábricas”. En países asiáticos, algunas especies como *Bombyx mori* (gusano de seda) se han utilizado para la producción de un gran número de proteínas recombinantes para diferentes usos industriales, en ciencia básica y aplicada, varias de las cuales ya han sido comercializadas. Por otro lado, especies como *Spodoptera frugiperda*, *Heliiothis virescens*, *Rachiplusia nu*, *Helicoverpa zea*, y *Trichoplusia ni* están ampliamente distribuidas en el mundo occidental y Europa y constituyen plagas que también pueden aprovecharse para la expresión de proteínas. La utilización de larvas de insectos para estos fines biotecnológicos tiene menor costo en comparación a los cultivos de líneas celulares de insectos, y una gran variedad de proteínas recombinantes, incluyendo enzimas, hormonas y vacunas, se han expresado eficientemente con actividad biológica intacta. Por lo tanto, la expresión de proteínas farmacéuticas usando larvas o capullos de insectos se ha convertido en una alternativa muy atractiva. Este documento describe el uso de larvas de insectos como alternativa para producir proteínas recombinantes comerciales.

SUMMARY**“INSECT LARVAE: A NEW PLATFORM TO PRODUCE RECOMBINANT PROTEINS OF COMMERCIAL INTEREST”**

In Biotechnology, the expression of recombinant proteins is a constantly growing field and different hosts are used for this purpose. Some valuable proteins cannot be produced using traditional systems. Insects from the order Lepidoptera infected with recombinant baculovirus have appeared as a good choice to express high levels of proteins, especially those with post-translational modifications. Lepidopteran insects, which are extensively distributed in the world, can be used as small protein factories, the new biofactories. Species like *Bombyx mori* (silkworm) have been explored in Asian countries to produce a great number of recombinant proteins for academic and industrial purposes. Several recombinant proteins produced in silkworms have already been commercialized. On the other hand, species like *Spodoptera frugiperda*, *Heliothis virescens*, *Rachiplusia nu*, *Helicoverpa zea* and *Trichoplusia ni* are widely distributed in both the occidental world and Europe. The expression of recombinant proteins in larvae has the advantage of its low cost in comparison with insect cell cultures. A wide variety of recombinant proteins, including enzymes, hormones and vaccines, have been efficiently expressed with intact biological activity. The expression of pharmaceutically relevant proteins, including cell/viral surface proteins and membrane proteins, using insect larvae or cocoons, has become very attractive. This review provides an overview of the production of recombinant proteins using insect larvae.

PALABRAS CLAVE: baculovirus, biofábricas, larvas de insectos, proteínas recombinantes.

KEY WORDS: baculovirus, biofactories, insect larvae, recombinant proteins,.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, hay una rápida y creciente demanda de procesos de bajo costo para producir biomoléculas biológicamente activas, como proteínas eucariotas, glicoproteínas, péptidos y lectinas. En Biotecnología, existen varios sistemas disponibles, incluyendo bacterias, levaduras, células de mamíferos, y cultivos celulares de insectos, que se usan como hospederos para producir proteínas recombinantes en poco tiempo (Chapple et al., 2006; Kärkkäinen et al., 2009). Los sistemas de células de insectos, incluyendo el sistema de expresión de baculovirus, se aplican ampliamente para producir proteínas con fines farmacéuticos o biotecnológicos. Estos sistemas proporcionan un patrón de modificación postraduccional similar al de las células de mamífero cuando se requiere un ambiente eucariota (Kato et al., 2010). Las proteínas expresadas por este sistema son correctamente plegadas y suelen ser biológicamente activas (Lee et al., 2012). En la mayoría de los casos, las líneas celulares de insecto Sf9, Sf21 o Hi Five se han utilizado como huéspedes de expresión. Nueve productos desarrollados en el sistema baculovirus-células de insecto ya han sido aprobados para uso humano y veterinario (Felberbaum, 2015). Sin embargo, el inconveniente más importante de la producción de proteínas recombinantes en cultivos celulares de insectos es su alto costo a escala industrial porque se necesitan instalaciones y reactores especializados en cultivo de líneas celulares (Ikonomou et al., 2003). Además, a escala industrial, el riesgo de contaminación es bastante alto. Según Vermasvuori et al. (2009), la producción de VIH-1 Nef utilizando estrategias basadas en células de insectos es cuatro veces más cara que en *Escherichia coli*. Utilizar directamente larvas de insectos vivas como "biofábricas" es una alternativa de bajo costo para expandir la producción de proteínas recombinantes. Este enfoque es muy atractivo y el costo de producción podría reducirse hasta cuatrocientas veces en contraste con el de cultivos de células de insectos (Wu et al., 2002; Seghal et al., 2003; Maio et al., 2006; Pérez-Filgueira et al., 2007). En

este trabajo, describimos el uso del sistema de expresión de baculovirus y larvas de insectos como biofábricas para escalar la expresión de proteínas recombinantes.

EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS: GENERALIDADES Y CONSTRUCCIÓN

Los baculovirus son virus de ADN con genoma circular de dos hebras, de 80-180 kbp en tamaño. La familia Baculoviridae infecta sólo poblaciones de artrópodos, es decir, no se replican en vertebrados, plantas ni microorganismos (Rychlowska *et al.*, 2011). Esto hace que el sistema de expresión de baculovirus sea seguro, desde el punto de vista del operador, para el desarrollo de proteínas recombinantes de uso humano y veterinario y se ha convertido en una reconocida plataforma para la producción de vectores de terapia génica y vacunas (Kato *et al.*, 2010). En Biotecnología, dos especies virales se utilizan comúnmente como vectores para expresar proteínas recombinantes: el virus de la poliedrosis nuclear de *Autographa californica* (AcMNPV), que es el vector de expresión de baculovirus más ampliamente utilizado, especialmente en países americanos y europeos, y el virus de la poliedrosis nuclear de *Bombyx mori* (BmNPV), principalmente adoptado en China, India, Japón y otros países asiáticos. Durante el proceso de infección natural, los baculovirus producen dos fenotipos virales con propiedades biológicas específicas: el virus ocluido (ODV) y el virus brotado (BV). Los ODVs permiten la transmisión horizontal del virus de insecto a insecto a través de grandes (1-5 μm) estructuras llamadas cuerpos de oclusión o poliedros, en los cuales están insertos los virus. Los poliedros, que contaminan los alimentos larvales, son ingeridos y los ODVs se liberan en el ambiente alcalino del intestino, infectando las células epiteliales columnares del intestino medio, el único tipo de célula susceptible. Después de la primera ronda de infección, los BVs producidos por el intestino medio diseminan la infección de célula a célula dentro del hospedero porque todos los tipos de la célula son susceptibles a esta forma viral. Basado en esto, las larvas de insecto pueden ser infectadas por inyección intrahemocélica de BV o por vía oral con poliedros diseminados en la dieta (Jinn *et al.*, 2009).

Los baculovirus tienen dos promotores muy fuertes: la poliedrina y el p10. Ambos se utilizan para expresar genes foráneos, porque sus productos son no-esenciales para la propagación de virus y la producción de BVs en cultivo celular. Es importante notar que la mayoría de los baculovirus recombinantes se construyen tradicionalmente sustituyendo el gen de la poliedrina (polh) con el gen de interés. Este tipo de baculovirus recombinantes son identificados como genotipo poliedrina-negativo (polh-) debido a su incapacidad para generar poliedros y, por lo tanto, su baja efectividad para infectar larvas por infección vía oral. Debido a esto, la aplicación de baculovirus recombinantes polh- está restringida a la infección intrahemocélica con BVs (Romero *et al.*, 2011; Summers, 2006). La construcción de un baculovirus recombinante polh- no se consigue mediante la clonación directa del gen foráneo porque el genoma de baculovirus es muy grande para manipular. Por lo tanto, la manera clásica de clonado es por recombinación: recombinación homóloga o transposición. El evento de recombinación homóloga es llevado a cabo dentro de las células de insecto por cotransfección con el vector de transferencia que contiene el gen foráneo y el genoma viral (Baculogold®, Pharmingen). Por otro lado, el evento de transposición se lleva a cabo dentro de una bacteria por transposición entre el vector de transferencia y un báculo que contenga el genoma completo del baculovirus y luego las células de los insectos son transfectadas con un báculo purificado del cultivo celular (sistema Bac-to-Bac®, Invitrogen). Estos dos sistemas comerciales para AcMNPV han sido extensamente estudiados (Kato *et al.*, 2010; Felberbaum, 2015; Rychlowska *et al.*, 2011). El sistema Bac-to-Bac® también fue desarrollado para BmNPV por Motohashi *et al.* (2015). Una vez que el baculovirus recombinante ha sido establecido (3 semanas), se utiliza para infectar larvas para producir proteínas recombinantes. Puesto que la infección oral con poliedros es un método más simple que la infección intrahemocélica cuando hay que

infectar un gran número de larvas de insectos, principalmente a gran escala de producción de proteínas, se han explorado alternativas para construir baculovirus recombinantes con capacidad de producir poliedros (genotipo poliedrina positivo o polh +). Je et al. (2001a y b) construyeron los bácmidos pBmGOZA y pAcGOZA, que permiten obtener virus recombinantes BmNPV y AcMNPVpolh +, respectivamente. En este caso, estos autores introdujeron el gen de interés en el locus de la poliedrina y el gen de la poliedrina estaba bajo el control del promotor p10. En nuestro laboratorio, utilizamos un baculovirus recombinante de genotipo polh+ para la infección vía oral de larvas de insectos mediante la administración de suspensiones poliédricas dosificadas en la dieta larvaria (Romero et al., 2010). Por otra parte, López et al. (2010) desarrollaron nuevas líneas de células de insecto estables que expresan poliedrina y que pueden ocluir baculovirus recombinante por trans-complementación para lograr un inóculo oral para larvas de insectos.

ESPECIES DE LARVAS DE INSECTOS Y SU SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN CON BACULOVIRUS

El orden Lepidoptera (mariposas y polillas), segundo orden en la clase Insecta, es un grupo de insectos que incluye más de 100.000 especies descritas hasta el momento. Muchos de ellos son considerados plagas destructivas durante su etapa larval y afectan cultivos de interés económico. *Spodoptera frugiperda*, *Spodoptera littoralis*, *Trichoplusia ni*, *Helicoverpa zea*, *Heliothis virescens* y *Rachiplusia nu* son algunas de las especies de lepidópteros ampliamente distribuidas alrededor del mundo, y que son hospederos permisivos para la infección por AcMNPV. Particularmente, existe interés industrial en las larvas de *T. ni*, la polilla de la col, porque son excelentes hospederos para AcMNPV y han sido ampliamente utilizadas para producir varias proteínas recombinantes en Biotecnología (Pérez-Filgueira et al., 2006; Jiménez de Oya et al., 2009). Actualmente, la producción a escala industrial de proteínas en larvas de *T. ni* se lleva a cabo por varias empresas (Chesapeake PERL, Savage, MD, Sysmex, Japón y ALGENEX, España).

Por otro lado, las larvas de *B. mori* tienen importancia económica en la producción de la seda, y por esta razón, esta especie ha sido domesticada durante miles de años, generalmente cultivada en hojas de morera (*Morus alba*). Además, estas larvas se han convertido en un sistema de modelo eucariota para la investigación científica. En particular, la larva del gusano de seda infectada con BmNPV recombinante ofrece varias ventajas: es fácil de criar, es grande (120 mm de largo en el último estadio), es fácil de manipular, tiene un ciclo de vida corto (7 semanas), y su genética y su biología están bien documentadas (Maeda et al., 1985). Las pupas del gusano de seda también se han utilizado como biorreactores. El factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos humanos y las partículas artificiales del virus de la gripe han sido producidas en pupas (Chen et al., 2006; Nerome et al., 2015). Otras especies como *S. frugiperda*, *H. zea*, *H. virescens* y *T. ni* también son relativamente fáciles de criar y producen cantidades similares o incluso más grandes que *B. mori*. En gusanos de seda, la proteína recombinante suele expresarse en hemolinfa y los métodos de purificación incluyen la extracción de hemolinfa de cada una de las larvas infectadas, lo que resulta impráctico en procesos a gran escala.

Otras especies como, *S. frugiperda*, *H. zea*, *H. virescens* y *T. ni* tienen cinco o seis estadios larvales dependiendo de la temperatura y el alimento, y llegan a sólo 35-40 mm de longitud. Todas estas especies también pueden ser criadas en condiciones de laboratorio. La especificidad de huésped del baculovirus hace que las larvas de *B. mori* no sean susceptibles a AcMNPV y que las larvas de *S. frugiperda*, *S. littoralis*, *T. ni*, *H. zea*, *H. virescens*, y *R. nu* no sean susceptibles a BmNPV. Recientemente, Park et al. (2014) reportaron que algunas cepas de gusanos de seda son altamente permisivas a AcMNPV.

Aunque todas las larvas son susceptibles a la infección intrahemocélica, diferentes especies de larvas han demostrado cierto grado de resistencia del desarrollo cuando el virus es administrado por vía oral. La resistencia a la infección aumenta con la edad, y esto es decisivo para elegir la ruta de infección (Romero *et al.*, 2010; Engelhard & Volkman, 1995; Kirkpatrick *et al.*, 1998; Haas-Stapleton *et al.*, 2005). Las larvas de *H. zea* y *S. frugiperda* son resistentes a la infección oral, pero altamente susceptibles a la infección con BVs inyectados en el hemocele, mientras que *H. virescens* y *R. nu* han demostrado susceptibilidad oral e intrahemocélica (Romero *et al.*, 2010; López *et al.*, 2010; Ferrer *et al.*, 2007a; Loustau *et al.*, 2008).

Las larvas de insectos diferentes a *B. mori* no son explotadas ampliamente, debido principalmente a la falta de conocimiento sobre la cría y el mantenimiento en laboratorios (Kost *et al.*, 2005). Si bien *B. mori* es un huésped muy eficiente, tiene valor comercial ya que se lo utiliza principalmente en la industria de la seda. En cambio, *R. nu*, *S. frugiperda* y otras especies de lepidópteros son plagas sin ningún valor económico. Por esta razón, es interesante explorar estas larvas como hospederos alternativos para producir proteínas recombinantes.

OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA PROTEÍNA EN LARVAS

El proceso de producción de proteínas en larvas es una tarea compleja, donde una de las cuestiones más importantes es la selección del vector de expresión que se utilizará. Otra decisión incluye seleccionar las larvas en la etapa de desarrollo apropiada. Las larvas deben ser lo suficientemente grandes como para facilitar la inyección pero que no estén listas para la formación de pupas. Además, la capacidad de síntesis de proteína de los insectos es óptima entre la cuarta y la quinta etapa larval.

El tiempo necesario para la expresión de proteínas recombinantes se debe monitorear en cada caso ya que puede variar con cada proteína en particular. Para determinar el nivel de expresión de la proteína blanco, el extracto larval se obtiene por homogenización en un buffer que controla el proceso de melanización (Loustau *et al.*, 2008). Generalmente hacen falta 3-5 días para llegar al pico de expresión de la proteína. Una vez realizado este paso de optimización y cuantificada la proteína, el proceso puede ser linealmente escalado. La disponibilidad de equipos automatizados para la cría de las larvas y el hecho de que las larvas son inofensivas para los operadores en laboratorio hacen que el escalado y la producción masiva de proteínas recombinantes sean muy atractivos para la producción comercial de proteínas. Con una instalación automatizada para la cría masiva y condiciones de trabajo controladas, es posible escalar para tener una producción de hasta varios kilogramos de proteína recombinante por semana. El rendimiento de proteínas recombinantes que contengan modificaciones post-traduccionales puede alcanzar valores en el rango de microgramos o miligramos por larva. Analizar los diferentes huéspedes y sus parámetros es de gran importancia a la hora de elegir el sistema de expresión. En nuestro laboratorio, las larvas fueron criadas a 24°C para producir isoenzima C de la peroxidasa de rábano picante (HRPC), una proteína que se utiliza como insumo para la fabricación de kits de diagnóstico, biocatalizadores y biosensores. Hemos comparado su potencial para la expresión mediante la infección con baculovirus recombinantes, ya sea por inyección de BVs o administración oral de poliedros. De las diferentes especies larvales estudiadas, *S. frugiperda* resultó la mejor opción para la expresión de HRPC (137 µg/g de larvas). Mediante infección oral, *R. nu* mostró un alto rendimiento de HRPC (110 µg/g de larvas) (Romero *et al.*, 2011). Por otra parte, la expresión de la misma enzima fue de 0,1 mg l⁻¹ en levaduras (Morawski *et al.*, 2000) y 41,3 mg l⁻¹ en células Sf9. En este último caso el costo de producción de la enzima recombinante resultó cien veces mayor que con el sistema larval (Targovnik *et al.*, 2010). Además, tanto la tasa de replicación viral como la susceptibilidad larval están influenciadas por la temperatura, por lo que este efecto también se ha estudiado en la expresión de HRPC

(Romero et al., 2010; Boucias et al., 1980; Kobayashi et al., 1981; Subramanian et al., 2006). Se observó que la expresión de HRPC en larvas de *S. frugiperda* y *R. un* aumentó 1,8-2,5 veces cuando la temperatura del cultivo se incrementó de 24°C a 27°C (Romero et al., 2011).

Por otro lado, cuando en nuestro laboratorio se expresó otra proteína recombinante como el interferón alfa felino, la alta temperatura sólo aceleró la cinética de expresión pero no tuvo ninguna influencia en el rendimiento del producto (Targovnik *et al.*, 2014). Por lo tanto, los parámetros deben ser evaluados según la proteína recombinante que va a ser producida.

Para alcanzar niveles más altos de expresión, se pueden implementar cambios en el vector del baculovirus de expresión. Por ejemplo, Gong *et al.* (2006) reportaron un importante incremento en el nivel de expresión de células de insecto de la subunidad B de la toxina del cólera cuando se incluyó el elemento genético que denominaron PPHS en la secuencia codificante. Este elemento también permite aumentar el rendimiento de HRPC hasta 1,8 veces en larvas de *R. un* ya que actúa como estimulador (Romero *et al.*, 2011).

LARVAS TRANSGÉNICAS PARA MODIFICAR EL PATRÓN DE GLICOSILACIÓN DE INSECTOS

Como ya fue mencionado, las larvas de insectos son una alternativa de bajo costo para producir proteínas de interés farmacéutico que a menudo requieren modificaciones postraduccionales semejantes a las de los mamíferos (Kato et al., 2010). Las glicoproteínas de mamíferos producidas en insectos son a menudo biológicamente activas. Sin embargo, las células de insectos generan N-glicanos más simples que los de los mamíferos (Felberbaum, 2015). Las proteínas nativas producidas por células de mamíferos son de tipo complejo, galactosiladas o sialiladas. En cambio, la estructura de los N-glicanos en glicoproteínas recombinantes de insectos es paucimanosa y las células son incapaces de añadir residuos terminales de galactosa y ácido siálico (Kubelka et al., 1994). Por lo tanto, las glicoproteínas recombinantes producidas en el sistema de expresión de baculovirus son menos estables en sangre que las glicoproteínas nativas de mamíferos (Morokuma et al., 2015). Para solucionar esta limitación, se han implementado varias estrategias, como líneas celulares de insectos transgénicos que expresan establemente las enzimas de glicosilación de mamíferos o la co-expresión de estas enzimas y el gen foráneo (Felberbaum, 2015). Estas tecnologías permitirían la expresión de proteínas recombinantes con N-glicanos del tipo de los mamíferos en larvas de insectos. Por ejemplo, el método para generar un gusano de seda transgénico es inyectar el transposón PiggyBac con una construcción blanco en huevos (Lee et al., 2012). Ya han sido expresadas algunas proteínas recombinantes farmacéuticas en la glándula de seda y producidas en capullos con un nivel de varios cientos de µg por mg de peso de capullo de gusano de seda transgénico (Tomita, 2010). Proteínas como colágeno humano (Tomita et al., 2003), interferón felino (Kurihara *et al.*, 2007) y un anticuerpo monoclonal de ratón (Iizuka *et al.*, 2009) han sido producidas mediante este sistema. Por lo tanto, si se mejorara la vía de glicosilación enzimática, el sistema de expresión de larvas de insectos podría ser usado para la producción de glicoproteínas de mamífero (Kato *et al.*, 2010).

EL SISTEMA DE BACULOVIRUS EN LARVAS DE INSECTO COMO UNA PLATAFORMA ALTERNATIVA PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FARMACÉUTICAS

El uso de larvas de insectos como "biofábricas" como alternativa de bajo costo para la producción de proteínas resulta una alternativa interesante y la primera prueba de expresión a escala laboratorio fue

de una interleuquina (Miyajima *et al.*, 1987). Hoy en día, se producen dos proteínas recombinantes comerciales para uso veterinario en *B. mori* por Toray Ind. Inc. (Tokio, Japón): Intercat, una droga compuesta de interferón felino, e Interdog, una droga compuesta de interferón gama canino. Además, el interferón felino actualmente se comercializa en Europa bajo el nombre de Virbagen Omega (Virbac).

La lista de proteínas recombinantes biofarmacéuticas producidas en este sistema, especialmente en los últimos años, es interminable. Muchas enzimas (Romero *et al.*, 2010; Loustau *et al.*, 2008; Medin *et al.*, 1990; Tremblay *et al.*, 1993), anticuerpos (Reis *et al.*, 1992; Gil *et al.*, 2010; Gómez-Sebastián *et al.*, 2012; O'Connell *et al.*, 2007; Encinas *et al.*, 2011), vacunas (Pérez-Filgueira *et al.*, 2007; Kuroda *et al.*, 1989; Zhou *et al.*, 1995; Millán *et al.*, 2010; Gómez-Casado *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2013; Faletti *et al.*, 2014; Deo *et al.*, 2011), proteínas de diagnóstico (Pérez-Filgueira *et al.*, 2006; Ahmad *et al.*, 1993; Ismail *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1995; Barderas *et al.*, 2000; Ferrer *et al.*, 2007b; Alonso-Padilla *et al.*, 2010), hormonas (Mathavan *et al.*, 1995; Sumathy *et al.*, 1996), lectinas (Urtasun *et al.*, 2014), y citoquinas (Targovnik *et al.*, 2014; Ueda *et al.*, 1992; Na *et al.*, 2008; Dudognon *et al.*, 2014; Dojima *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007) han sido eficientemente expresadas en larvas de insectos con altos rendimientos utilizando baculovirus recombinantes como vectores. Algunas de las proteínas de importancia biomédica expresadas en larvas infectadas con BmNPV o AcMNPV están bien resumidas en diferentes trabajos (Kato *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2012; Seghal *et al.*, 2003). Las Tablas 1 y 2 muestran un resumen de las proteínas recombinantes biofarmacéuticas relevantes obtenidas en larvas de insectos infectadas con AcMNPV y BmNPV recombinante, respectivamente.

Proteína	Huésped	Expresión (µg/g larva)	Referencias
Isoenzima C de la peroxidasa de rábano picante	<i>R. nu</i>	480	Romero <i>et al.</i> , 2010
Interferón alfa felino	<i>R. nu</i>	116	Targovnik <i>et al.</i> , 2014
Neuraminidasa(cepaH1N1)	<i>R. nu</i>	1200	Faletti <i>et al.</i> , 2014
Aglutinina del germen de trigo	<i>R. nu</i>	346,6	Urtasun <i>et al.</i> , 2014
Isoenzima C de la peroxidasa de rábano picante	<i>S. frugiperda</i>	315	Romero <i>et al.</i> , 2010
Interferón alfa felino	<i>S.frugiperda</i>	22	Targovnik <i>et al.</i> , 2014
Proteína de la cápside del virus de la enfermedad hemorrágica de conejo	<i>T. ni</i>	6000	Pérez-Filgueira <i>et al.</i> , 2007
Adenosina desaminasa humana	<i>T. ni</i>	386	Medin <i>et al.</i> , 1990
Anticuerpo recombinante de cadena única MHC clas II moleculae epitope	<i>T. ni</i>	2800-3200	Gil <i>et al.</i> , 2010
Glicoproteína G del virus de la septicemia viral hemorrágica	<i>T. ni</i>	900	Encinas <i>et al.</i> , 2011
VLPs de virus papiloma humano	<i>T. ni</i>	18000-21000	Millán <i>et al.</i> , 2010
Hemaglutinina (cepaH1N1)	<i>T. ni</i>	340	Gómez <i>et al.</i> , 2011
Factor de crecimiento epidérmico humano	<i>T. ni</i>	9100	Dudognon <i>et al.</i> , 2014
Factor de crecimiento de fibroblastos humano	<i>T. ni</i>	2600	Dudognon <i>et al.</i> , 2014
Factor de crecimiento de queratinocitos humano	<i>T. ni</i>	3000	Dudognon <i>et al.</i> , 2014

Tabla 1. Proteínas biofarmacéuticas expresadas en larvas de *R. nu*, *S. frugiperda* y *T.ni* infectadas con AcMNPV recombinante.

Proteína	Nivel de expresión	Referencias
Interferón alfa humano	20 µg por larva	Maeda <i>et al.</i> , 1985
Factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos	100 µg por pupa	Chen <i>et al.</i> , 2006
Partículas similares a virus de hemaglutininaH5	2 mg por pupa	Nerome <i>et al.</i> , 2015
Procolágeno tipoIII humano	70 µg por pupa	Tomita <i>et al.</i> , 2003
Interferón felino	1-5 mg por pupa	Kurihara <i>et al.</i> , 2007
Anticuerpo monoclonal de ratón	139-319 ng por 0,1mg capullo	Iizuka <i>et al.</i> , 2009
Interleukina-3 de ratón	0,5 mg por larva	Miyajima <i>et al.</i> , 1987
Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B	750 µg por larva	Zhou <i>et al.</i> , 1995
Hemaglutinina (cepaH5N1)	17 µg por larva	Dong <i>et al.</i> , 2013
Partículas similares al virus RSV-gag	38 mg por larva	Deo <i>et al.</i> , 2011
Hormona paratiroidea humana	70 mg por L de hemolinfa	Mathavan <i>et al.</i> , 1995
Hormona de crecimiento humana	20-50 µg por larva	Sumathy <i>et al.</i> , 1996
Interferón felino	1,2x10 ⁸ U por mL de hemolinfa	Ueda <i>et al.</i> , 1992
Interferón alfa canino	528 µg por larva	Na <i>et al.</i> , 2008
Interferón -τ bovino	45 µg por larva	Liu <i>et al.</i> , 2007

Tabla 2. Proteínas biofarmacéuticas expresadas en pupas y larvas de *B. mori* infectadas con BmNPV recombinante.

Por ejemplo, el fragmento de anticuerpo anti-botulínico de ratón (Fab) se ha expresado en larvas *T. ni* con un rendimiento total de 1,1µg por g de larvas (O’Connell *et al.*, 2007). Resultados similares han sido obtenidos con partículas similares a virus basadas en proteína antigénica (*virus like particles*, VLPs). Deo *et al.* (2011) lograron la expresión de VLPs del sarcoma de Rousen en larvas del gusano de seda. El rendimiento de las VLPs fue aproximadamente 8,2 veces mayor que el obtenido en líneas celulares estables. También se obtuvieron altos niveles de aglutinina de germen de trigo recombinante en *R. nu*, donde los rendimientos alcanzaron a 346,6 µg por g de larvas. Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos estudiado diferentes procesos de purificación sencillos para la purificación masiva de proteínas recombinantes. Algunos de ellos basados en un sistema de dos fases acuosas acoplado a cromatografía de afinidad usando mini-esferas de quitosano (Urtasun *et al.*, 2014). El interferón alfa felino ha sido expresado en larvas de *R. nu* con una producción de 116 µg por g de larvas o $3,7 \times 10^6$ U/ml y en larvas de *S. frugiperda* 22 µg por g de larvas o $1,1 \times 10^6$ U/ml (Targovnik *et al.*, 2014). El interferón felino también se ha expresado en larvas de *B. mori*, con un rendimiento de $1,2 \times 10^8$ U/ml de líquido corporal (Ueda *et al.*, 1992) y 528 µg por g de larvas (Na *et al.*, 2008), respectivamente. Nuestro grupo de trabajo, ha expresado además neuraminidasa de la Influenza A H1N1 con alto rendimiento en larvas de *R. nu* (1,2 mg por g de larva), resultando ésta una alternativa rentable muy atractiva a los métodos convencionales basados en cultivo celular para la expresión de este importante antígeno de la gripe (Faletti *et al.*, 2014). Dojima *et al.* (2010) han expresado anticuerpos en insectos enteros en el rango de mg de Fab purificado por g de larvas. Todos estos resultados indican que las larvas de insectos son una atractiva plataforma para aplicar en el desarrollo de vacunas.

EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

El procesamiento río abajo de la producción de proteínas recombinantes a partir de larvas de insectos no ha sido estudiado profundamente. La diversidad de proteínas que se han producido en larvas de insectos es tan grande que el desarrollo de métodos estándar resulta difícil.

La elección de una estrategia específica para la purificación a gran escala, depende de la localización de la proteína blanco, el rendimiento obtenido, la pureza requerida y el precio del producto. El objetivo del paso de purificación es separar las proteínas contaminantes presentes en el huésped, las proteínas virales, ADN y partículas virales. Una de las dificultades principales es la alta actividad de las proteasas que pueden degradar la proteína recombinante durante el paso de homogenización de las larvas. La cantidad y la calidad del producto están fuertemente influenciadas por el momento en que se realiza la cosecha. A medida que avanza el ciclo viral, las células se lisan y una gran cantidad de proteasas intracelulares y glicosidasas aparecen en el homogenato. El primer paso es conseguir un homogenato de larvas de insectos clarificado. Este paso generalmente se realiza por centrifugación o filtración para separar los tejidos y eliminar los lípidos. La solución clarificada debe tener un color amarillo verdoso. Además, es importante inhibir el proceso de melanización para evitar pérdidas en el rendimiento de proteína porque éste interfiere con el proceso de purificación (Nagaya *et al.*, 2004).

El procedimiento para purificar proteínas recombinantes de larvas de insectos es similar a los comúnmente utilizados para purificar proteínas de otros organismos con técnicas estándar (Felberbaum, 2015). La cromatografía de intercambio iónico y de afinidad han demostrado ser eficientes para purificar diferentes proteínas de extractos larvales (Romero *et al.*, 2011; Targovnik *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007). En general, las proteínas son fusionadas con etiquetas de residuos de histidina y luego purificadas mediante cromatografía de afinidad con iones metálicos inmovilizados. Para la recuperación y purificación de proteínas de interés comercial, la industria biotecnológica exige procesos rápidos, eficientes y de bajo costo. Sin embargo, la complejidad de los extractos de larvas de insectos causa algunos inconvenientes como, por ejemplo, la posibilidad de afectar las matrices cromatográficas disminuyendo su vida media. Algunas alternativas de bajo costo para el procedimiento de purificación, tales como la utilización de sistemas de dos fases acuosas y matrices basadas en mini-esferas de quitosano, han sido siendo implementadas con éxito (Urtasun *et al.*, 2014; Targovnik *et al.*, 2012). Sin embargo, el sistema de purificación seleccionado dependerá de las características fisicoquímicas de la proteína recombinante y sus contaminantes y, en este sentido, se está estudiando el proteoma de las larvas autóctonas que se aplicarían como biofábricas.

CONCLUSIÓN

Los biofármacos representan el sector de más rápido crecimiento de la industria farmacéutica a nivel mundial, impulsado por una fabricación rápida y exitosa de fármacos basados en proteínas recombinantes. Para satisfacer la demanda, es crucial aumentar el rendimiento de los sistemas de expresión y procesos de purificación.

Las larvas de insectos infectadas con baculovirus pueden servir como biofábricas naturales para sintetizar proteínas de interés *in vivo*. La Figura 1 resume todo el proceso para producir proteínas recombinantes en larvas de insectos. El alto rendimiento de proteína reportado en homogenatos de 3-5 días post-infección y muy bajos costos de producción hace que las biofábricas sean una alternativa muy atractiva a los huéspedes tradicionales como las levaduras o las células de mamíferos.

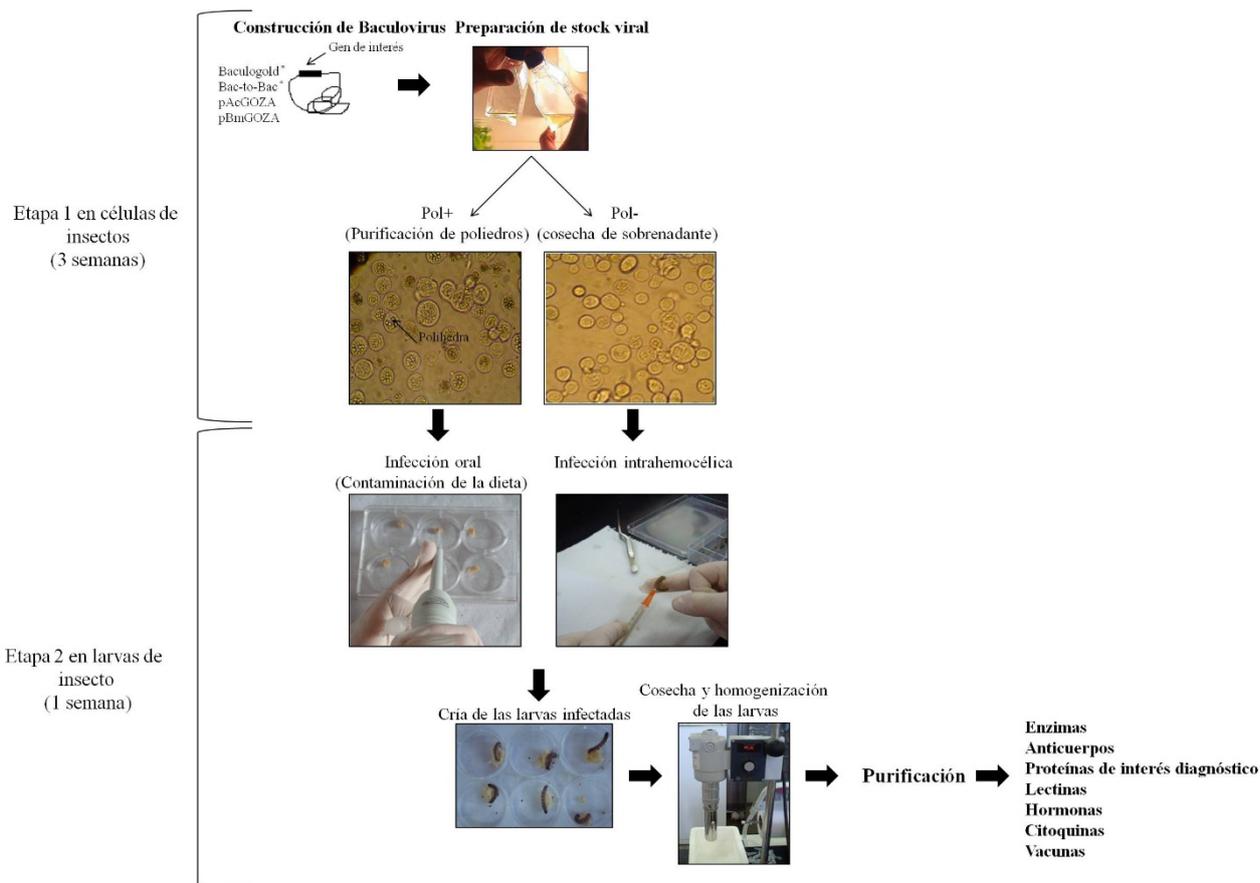


Figura 1 .Proceso de producción de proteínas recombinantes en larvas de insectos.

El proceso de producción de proteínas recombinantes en larvas de insectos implica un primer paso en células de insectos y un segundo paso en larvas.

Paso 1 en células de insecto: el gen de interés se incorpora en el genoma del baculovirus (Bac-to-Bac®, Baculogold®, pAcGOZA, pBmGOZA). La construcción de los baculovirus recombinantes y la preparación del stock de virus lleva tres semanas. Si el virus es genotipo polh+, se purifican poliedros de células de insecto; en cambio, si el virus es polh-, se cosecha el sobrenadante para infectar las larvas de insectos. Paso 2 en larvas de insecto: después de producir el stock viral, el proceso para expresar y purificar proteína recombinante de larvas toma sólo una semana. Las larvas son infectadas vía infección oral (Virus polh+) o intrahemocélica (Virus polh-) con baculovirus recombinante. Las larvas pueden ser criadas bajo condiciones de laboratorio y alimentadas con una dieta a 23–25°C en una cámara humidificada al 70%, con un fotoperíodo de 16:8 (L:O). Después de 3-5 días, las larvas son cosechadas y homogeneizadas. Finalmente, la proteína (enzima, anticuerpo, proteína diagnóstico, lectina, hormona, citoquina, vacuna) recombinante se purifica usando técnicas estándar.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahmad, S.M. Bassiri, A.K. Banerjee & T. Yilma (1993) Immunological characterization of the VSV nucleocapsid (N) protein expressed by recombinant baculovirus in *Spodoptera exigua* larva: use in differential diagnosis between vaccinated and infected animals. *Virology* 192: 207-16.
- Alonso-Padilla, J., N. Jiménez de Oya, A. Blázquez, E. Loza-Rubio, J.M. Escribano, J. Saiz, et al. (2010) Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for detection of West Nile virus infection based on a recombinant envelope protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J. Virol. Methods* 166: 37-41.
- Barderas, M., A. Wigdorovitz, F. Merelo, F. Beitia, C. Alonso, M. Borca, et al. (2000) Serodiagnosis of African swine fever using the recombinant protein p30 expressed in insect larvae. *J. Virol. Methods* 86: 129-36.
- Boucias, D.G., D.W. Johnson & G.E. Allen (1980) Effects of host age, virus dosage, and temperature on the infectivity of a nucleopolyhedrosis virus against velvet bean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis*, larvae. *Environ. Entomol.* 9: 59-61.
- Chapple, S., A. Crofts, S. Shadbolt, J. McCafferty & M. Dyson (2006) Multiplexed expression and screening for recombinant protein production in mammalian cells. *BMC Biotechnol.* 6: 1-15.
- Chen, J., X.F. Wu & Y.Z. Zhang (2006) Expression, purification and characterization of human GM-CSF using silkworm pupae (*Bombyx mori*) as a bioreactor. *J. Biotechnol.* 123: 236-47.
- Deo, V.K., Y. Tsuji, T. Yasuda, T. Kato, N. Sakamoto, H. Suzuki, et al. (2011) Expression of an RSV-gag virus-like particle in insect cell lines and silkworm larvae. *J. Virol. Methods* 177: 142-52.
- Dojima, T., T. Nishina, T. Kato, T. Uno, H. Yagi, K. Kato, et al. (2010) Improved secretion of molecular chaperone-assisted human IgG in silkworm, and no alterations in their N-linked glycan structures. *Biotechnol. Prog.* 26: 232-8.
- Dong, J., M. Harada, S. Yoshida, A. Murakawa, M. Ogata, T. Kato, et al. (2013) Expression and purification of bioactive hemagglutinin protein of highly pathogenic avian influenza A (H5N1) in silkworm larvae. *J. Virol. Methods* 194: 271-6.
- Dudognon, B., L. Romero-Santacreu, S. Gómez-Sebastián, A.B. Hidalgo, J. López-Vidal, M.L. Bellido, et al. (2014) Production of functional active human growth factors in insect used as living factories. *J. Biotechnol.* 184: 229-39.
- Encinas, P., S. Gómez-Sebastián, M.C. Núñez, E. Gómez-Casado, J.M. Escribano, A. Estepa, et al. (2011) Antibody recognition of the glycoprotein G of viral haemorrhagic septicemia virus (VHSV) purified in large amounts from insect larvae. *BMC Res. Notes* 4: 1-7.
- Engelhard, E.K. & L.E. Volkman (1995) Developmental resistance in fourth instar *Trichoplusia ni* orally inoculated with *Autographa californica* M nuclear polyhedrosis virus. *Virology* 209: 384-9.
- Faletti, L.E., N. Urtasun, A.M. Targovnik, M.B. Arregui, G.J. Levin, G. Maroniche, et al. (2014) Expression of recombinant influenza A H1N1 neuraminidase in *Rachiplusia ni* larvae. *Curr. Topics Virol.* 12: 65-75.
- Felberbaum, R.S. (2015) The baculovirus expression vector system: A commercial manufacturing platform for viral vaccines and gene therapy vectors. *Biotechnol. J.* 10: 702-14.
- Ferrer, F., S. Zoth, G. Calamante & O. Taboga (2007a) Induction of virus-neutralizing antibodies by immunization with *Rachiplusia nu* per os infected with a recombinant baculovirus expressing the E2 glycoprotein of bovine viral diarrhea virus. *J. Virol. Methods* 146: 424-7.
- Ferrer, E., L. González, J. Martínez-Escribano, M. González-Barderas, M. Cortez, I. Dávila, et al. (2007b) Evaluation of recombinant HP6-Tsag, an 18 kDa *Taenia saginata* oncospherical adhesion protein, for the diagnosis of cysticercosis. *Parasitol. Res.* 101: 517-25.
- Gil, F., M. Pérez-Filgueira, M. Barderas, C. Pastor-Vargas, C. Alonso, F. Vivanco, et al. (2010) Targeting antigens to an invariant epitope of the MHC Class II DR molecule potentiates the immune response to subunit vaccines. *Virus Res.* 155: 55-60.
- Gómez-Casado, E., S. Gómez-Sebastián, M.C. Núñez, R. Lasa-Covarrubias, S. Martínez-Pulgarín & J.M. Escribano (2011) Insect larvae biofactories as a platform for influenza vaccine production. *Protein Expr.Purif.* 79: 35-43.
- Gómez-Sebastián, S., M.C. Nuñez, L. Garaicoechea, C. Alvarado, M. Mozgovej, R. Lasa, et al. (2012) Rotavirus A-specific single-domain antibodies produced in baculovirus-infected insect larvae are protective in vivo. *BMC Biotechnol.* 7: 1-11.
- Gong, Z., Y. Jin & Y. Zhang (2006) Incorporation of partial polyhedrin homology sequences (PPHS) enhances the production of cloned foreign genes in a baculovirus expression system. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 43: 165-70.

- Haas-Stapleton, E.J., J.O. Washburn & L.E. Volkman (2005) *Spodoptera frugiperda* resistance to oral infection by *Autographa californica* multiple nucleopolyhedrovirus linked to aberrant occlusion-derived virus binding in the midgut. *J. Gen. Virol.* 86: 1423-34.
- Iizuka, M., S.Ogawa, A. Takeuchi, S. Nakakita, Y. Kubo, Y. Miyawaki, et al. (2009) Production of a recombinant mouse monoclonal antibody in transgenic silkworm cocoons. *FEBS J.* 276: 5806-20.
- Ikonomou, L., Y. Schneider & S. Agathos (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62: 1-20.
- Ismail, R., R. Yamanaka, J. Saliki, A. El-Kholy, C. Mebus & T. Yilma (1995) Cloning and expression of the nucleoprotein of peste des petits ruminants virus in baculovirus for use in serological diagnosis. *Virology* 208: 776-8.
- Je, Y.H., J.H. Chang, M.H. Kim, J.Y. Roh, B.R. Jin & D.R. O'Reilly (2001a) The use of defective *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus genomes maintained in *Escherichia coli* for the rapid generation of occlusion-positive and occlusion-negative expression vectors. *Biotechnol. Lett.* 23: 1809-17.
- Je, Y.H., J.H. Chang, J.Y. Roh & B.R. Jin (2001b) Generation of baculovirus expression vector using defective *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis virus genome maintained in *Escherichia coli* for OCC+ virus production. *Int. J. Indust. Entomol.* 2: 155-60.
- Jiménez de Oya, N., I. Galindo, O. Gironés, E. Duizer, J.M. Escribano & J.C. Saiz (2009) A serological immunoassay for Hepatitis E virus (HEV) diagnosis based on genotype 3 Open Reading frame-2 (ORF-2) recombinant proteins produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J. Clin. Microbiol.* 10: 3276-82.
- Jinn, T.R., S.S. Kao, Y.J. Chen & T.Y. Wu (2009) Aerosol infectivity of a Baculovirus to *Trichoplusia ni* larvae: An alternative larval inoculation strategy for recombinant protein production. *Biotechnol. Prog.* 25: 384-9.
- Kärkkäinen, H., J. Lesch, A. Määttä, P. Toivanen, A. Mähönen, M. Roschier, et al. (2009) A 96-well format for a high throughput baculovirus generation, fast titering and recombinant protein production in insect and mammalian cells. *BMC Res. Notes* 2: 1-6.
- Kato, T., M. Kajikawa, K. Maenaka & E.Y. Park (2010) Silkworm expression system as a platform technology in life science. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85: 459-70.
- Katz, J., A. Shafer & K. Eernisse (1995) Construction and insect larval expression of recombinant vesicular stomatitis nucleocapsid protein and its use in competitive ELISA. *J. Virol. Methods* 54: 145-51.
- Kirkpatrick, B.A., J.O. Washburn & L.E. Volkman (1998) AcMNPV pathogenesis and developmental resistance in fifth instar *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* 72: 63-72.
- Kobayashi, M., S. Inagaki & S. Kawase (1981) Effect of high temperature on the development of nuclear polyhedrosis virus in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 38: 386-94.
- Kost, T.A., J.P. Condreay & D.L. Jarvis (2005) Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 23: 567-75.
- Kubelka, V., F. Altmann, G. Kornfeld & L. März (1994) Structures of the N-linked oligosaccharides of the membrane glycoproteins from three lepidopteran cell lines (Sf-21, IZD-Mb-0503, Bm-N). *Arch. Biochem. Biophys.* 308: 148-58.
- Kurihara, H., H. Sezutsu, T. Tamura & K. Yamada (2007) Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworm using the fibroin H-chain expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355: 976-80.
- Kuroda, K., A. Groner, K. Frese, D. Drenckhahn, C. Hauser, E. Rott, et al. (1989) Synthesis of biologically active influenza virus hemagglutinin in insect larvae. *J. Virol.* 63: 1677-85.
- Lee, J.M., H. Mon, Y. Banno, K. Liyama & T. Kusakabe (2012) *Bombyx mori* strains useful for efficient recombinant protein production using baculovirus vector. *J. Biotechnol. Biomaterial* S9:003. doi:10.4172/2155-952X.S9-003.
- Liu, H., P. Jiravanichpaisal, L. Cerenius, B.L. Lee, I. Soderhall & K. Soderhall (2007) Phenoloxidase is an important component of the defense against *Aeromonas hydrophila* infection in a crustacean, *Pacifastacus leniusculus*. *J. Biol. Chem.* 282: 33593-8.
- López, M.G., V. Alfonso, E. Carrillo & O. Taboga (2010) Transcomplementation of polyhedrin by a stable transformed Sf9 insect cell line allows occ- baculovirus occlusion and larval per os infectivity. *J. Biotechnol.* 145: 199–205.
- Loustau, M., L. Romero, G.J. Levin, M.L. Magri, M. López, O. Taboga, et al. (2008) Expression and purification of horseradish peroxidase in insect larvae. *Process Biochem.* 43:103-7.

- Maeda, S., T. Kawai, M. Obinata, H. Fujiwara, T. Horuchi, Y. Saeki, et al. (1985) Production of human alpha-interferon in silkworm using a baculovirus vector. *Nature* 315: 592-4.
- Maio, Y.G., A.C. Zhao, Y.S. Zhang, K. Nakagaki, Y. Meng, T.F. Zhao, et al. (2006) Silkworm *Bombyx mori* larvae expressed the spider silk protein through a novel Bac-to- Bac/BmNPV baculovirus. *J. Appl. Entomol.* 130: 297-301.
- Mathavan, S., V. Gautvik, E. Rokkones, O. Olstad, B. Kareem, S. Maeda, et al. (1995) High-level production of human parathyroid hormone in *Bombyx mori* larvae and BmN cells using recombinant baculovirus. *Gene* 167: 33-9.
- Medin, J., L. Hunt, K. Gathy, R. Evans & M. Coleman (1990) Efficient, low-cost protein factories: expression of human adenosine deaminase in baculovirus-infected insect larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87: 2760-4.
- Millán, A., S. Gómez-Sebastián, M. Núñez, J. Veramendi & J.M. Escribano (2010) Human papillomavirus-like particles vaccine efficiently produced in a non-fermentative system based on insect larvae. *Protein Expr. Purif.* 74: 1-8.
- Miyajima, A., J. Schreurs, K. Otsu, A. Kondo, K. Arai & S. Maeda (1987) Use of the silkworm, *Bombyx mori*, and an insect baculovirus vector for high level expression and secretion of biologically active mouse interleukin-3. *Gene* 58: 273-81.
- Morokuma, D., J. Xu, K. Mon, M. Hino, S. Kuboe, M. Yamashita, et al. (2015) Human alpha 1-acid glycoprotein as a model for glycoanalysis in baculovirus expression vector system. *J. Asia-Pacific Entomol.* 18: 303-9.
- Morawski, B., Z. Lin, P. Cirino, H. Joo & F.H. Arnold (2000) Functional expression of horseradish peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*. *Protein Eng.* 13: 377-84.
- Motohashi, T., T. Shimojima, T. Fukagawa, K. Maenaka & E.Y. Park (2015) Efficient large-scale protein production of larvae and pupae of silkworm by *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus bacmid system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 326: 564-9.
- Na, Z., Y. Huipeng, L. Lipan, C. Cuiping, M.L. Umashankar, L. Xingmeng, et al. (2008) Efficient production of canine interferon-alpha in silkworm *Bombyx mori* by use of a BmNPV/Bac-to-Bac expression system. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78: 221-6.
- Nagaya, H., T. Kanaya, H. Kaki, Y. Tobita, M. Takahashi, H. Takahashi, et al. (2004) Establishment of a large-scale purification procedure for purified recombinant bovine interferon- τ produced by silkworm-baculovirus gene expression system. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 1395-401.
- Nerome, K., S. Sugita, K. Kuroda, T. Hirose, S. Matsuda, K. et al. (2015) The large-scale production of an artificial influenza virus-like particle vaccine in silkworm pupae. *Vaccine* 33: 117-25.
- O'Connell, K.P., E. Kovaleva, J.H. Campbell, P.E. Anderson, S.G. Brown, D.C. Davis, et al. (2007) Production of a recombinant antibody fragment in whole insect larvae. *Mol. Biotechnol.* 36: 44-51.
- Park, Y.M., K.A. Kim, M.U. Kang, K.H. Park & S.K. Nho (2014) Screening of silkworm strains for efficient recombinant protein production by *Autographa californica* nucleopolyhedrosis virus (AcMPV). *Int. J. Indust. Entomol.* 28: 10-8.
- Pérez-Filgueira, M., F. González, C. Gallardo, E. Resino, E. Blanco & J.M. Escribano (2006) Optimization and validation of recombinant serological tests for African swine fever diagnosis based on the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae. *J. Clin. Microbiol.* 44: 3114-21.
- Pérez-Filgueira, D., P. Resino-Talavan, C. Cubillos, I. Angulo, M. Barderas, J. Barcena, et al. (2007) Development of a low-cost, insect larvae-derived recombinant subunit vaccine against RHDV. *Virology* 364: 422-30.
- Reis, U., B. Blum, B. Von Specht, H. Domdey & J. Collins (1992) Antibody production in silkworm cells and silkworm larvae infected with a dual recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Biotechnology* 10: 910-2.
- Romero, L., A.M. Targovnik, F.J. Wolman, M. Fogar, M. Simonella, O. Cascone et al. (2010) Recombinant peroxidase production in species of lepidoptera frequently found in Argentina. *New Biotechnol.* 27: 857-61.
- Romero, L., A.M. Targovnik, F.J. Wolman, O. Cascone & M.V. Miranda (2011) *Rachiplusia nu* larva as a biofactory to achieve high level expression of horseradish peroxidase. *Biotechnol. Lett.* 33: 947-56.
- Rychlowska, M., B. Gromadzka, K. Bienkowska-Szewczyk & B. Szewczyk (2011) Application of baculovirus-insect cell expression system for human therapy. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 12: 1840-9.
- Seghal, D., P.S. Malik & S. Jameel (2003) Purification and diagnostic purity of a recombinant hepatitis E virus capsid protein expressed in insect larvae. *Protein Expr. Purif.* 27: 27-34.

- Subramanian, S., G. Santharam, N. Sathiah, J.S. Kennedy & R.J. Rabindra (2006) Influence of incubation temperature on productivity and quality of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *Biol. Control*. 37: 367-74.
- Sumathy, S., V. Palhan & K. Gopinathan (1996) Expression of human growth hormone in silkworm larvae through recombinant *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *Protein Expr. Purif.* 7: 262-8.
- Summers, M. (2006) Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Adv. Virus Res.* 68: 3-73.
- Targovnik, A.M., L. Romero, F.J. Wolman, O. Cascone & M.V. Miranda (2010) Horseradish peroxidase production from *Spodoptera frugiperda* larvae: a simple and inexpensive method. *Process. Biochem.* 45: 835-40.
- Targovnik, A.M., O. Cascone & M.V. Miranda (2012) Extractive purification of recombinant peroxidase isozyme C from insect larvae in aqueous two-phase systems. *Sep. Purif. Technol.* 98: 199-205.
- Targovnik, A.M., M.S. Villaverde, M.B. Arregui, M. Fogar, O. Taboga, G.C. Glikin, L.M.E. Finocchiaro, O. Cascone & Miranda, M.V. (2014) Expression and purification of recombinant feline interferon in baculovirus-insect larvae system. *Process Biochem.* 49: 917-26.
- Tomita M. (2010) Transgenic silkworms that weave recombinant proteins into silk cocoons. *Biotechnol. Lett.* 33: 645-54.
- Tomita M., H. Munetsuna, T. Sato, T. Adachi, R. Hino, M. Hayashi, et al. (2003) Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.* 21: 52-6.
- Tremblay N., B. Kennedy, I. Street, W. Kaupp, F. Laliberte & P. Weech (1993) Human group II phospholipase A2 expressed in *Trichoplusia ni* larvae-isolation and kinetic properties of the enzyme. *Prot. Expr. Purif.* 4: 490-8.
- Ueda Y., T. Sakurai & A. Yanai (1992) Homogeneous production of feline interferon in silkworm by replacing single amino acid code in signal peptide region in recombinant baculovirus and characterization of the product. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 252-8.
- Urtasun, N., M.F. Baieli, O. Cascone, F.J. Wolman & M.V. Miranda (2014) High-level expression and purification of recombinant wheat germ agglutinin in *Rachiplusia nu* larvae. *Process Biochem.* 50: 40-7.
- Vermasvuori, R., J. Koskinen, K. Salonen, N. Sirén, J. Weegar, N. Dahlbacka, et al. (2009) Production of recombinant HIV-1 nef protein using different expression host systems: a techno-economical comparison. *Biotechnol. Prog.* 25: 95-102.
- Wu, D., K. Murakami, N. Liu, Y. Inoshima, T. Yokoyama, T. Kokuho, et al. (2002) Expression of biologically active recombinant equine interferon by two different baculovirus gene expression systems using insect cells and silkworm. *Cytokine* 20: 63-9.
- Zhou, N., Y. Zhang, W. Jing, Z. Li & X. Wu (1995) High expression of HBV S gene in *Bombyx mori* cell culture and in silkworms. *Chin. J. Biotechnol.* 11: 149-56.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por subsidios de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de la República Argentina [PICT 1881], Universidad de Buenos Aires [20020100100108], el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina [PIP 00052] y el Ministerio de Salud Pública de la República Argentina.