

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de Posgrado de Bioprocesos

**PRODUCCIÓN EN *Escherichia coli* DE ANTÍGENOS VIRALES
RECOMBINANTES EN UN BIORREACTOR POR LOTE DE TANQUE
AGITADO**

Opción de titulación que para obtener grado de:

Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

M. en C. Karla Ivon Solís Andrade

Director de Tesis:

Dr. Sergio Rosales Mendoza

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

SEPTIEMBRE, 2023.

El programa de Doctorado en Ciencias en Bioprocesos de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Sistema Nacional de Posgrados (SNP) del CONAHCyT, registro 000590, en el nivel Consolidado. Número de registro de la beca otorgada por CONAHCyT 704884 con número de CVU 233521

Con el financiamiento de:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, número de financiamiento, C-146/2021 y 321364.

Proyecto realizado en:

Laboratorio de Biofarmacéuticos del Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí



PRODUCCIÓN EN *Escherichia coli* DE ANTÍGENOS VIRALES RECOMBINANTES EN UN BIORREACTOR POR LOTE DE TANQUE AGITADO por Karla Ivon Solís Andrade se distribuye bajo una

[Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

[Visualizador de documentos](#)

Índice de similitud

54%

PRODUCCIÓN EN *Escherichia coli* DE ANTÍGENOS VIR...

Por: Karla Ivon Solís Andrade



FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Programa de Posgrado de Bioprocesos

PRODUCCIÓN EN *Escherichia coli* DE ANTÍGENOS VIRALES
RECOMBINANTES EN UN BIORREACTOR POR LOTE DE TANQUE
AGITADO

Opción de titulación que para obtener grado de:

Doctor en Ciencias en Bioprocesos

Presenta:

M. en C. Karla Ivon Solís Andrade

Sinodales

Presidente: Dr. Omar González Ortega _____

Secretario: Dr. Sergio Rosales Mendoza _____

Vocal: Dra. Diana Patricia Portales Pérez _____

Vocal: Dr. Mariano García Soto _____

Vocal: Dra. Elizabeth Monreal Escalante _____

SAN LUIS POTOSÍ, S.L.P.

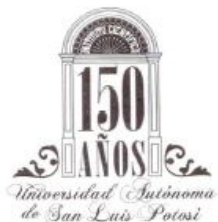
SEPTIEMBRE, 2023.



San Luis Potosí, S.L.P.
Septiembre 04, 2023

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias en Bioprocesos
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por la alumna de Doctorado M. en C. Karla Ivon Solís Andrade, titulada “PRODUCCIÓN EN *Escherichia coli* DE ANTÍGENOS VIRALES RECOMBINANTES EN UN BIORREACTOR POR LOTE DE TANQUE AGITADO”, ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 14 de septiembre a las 12 hrs. en el Auditorio Chico (G203), de la Facultad.



ATENTAMENTE

Dr. Sergio Rosales Mendoza _____
Director de Tesis

Dr. Omar González Ortega _____
Asesor

Dr. Mariano García Soto _____
Asesor

Dra. Diana Patricia Portales Pérez _____
Asesora



**FACULTAD DE
CIENCIAS QUÍMICAS**

Av. Dr. Manuel Nava Núm. 6
Zona Universitaria • CP 78210
San Luis Potosí, S.L.P.
tel. (444) 826 24 40 al 46
fax (444) 826 2372
www.uaslp.mx

Agradecimientos Académicos.

Al Dr. Sergio Rosales por brindarme la oportunidad trabajar con su equipo de investigación. Por evaluación y revisión de los temas desarrollados en el doctorado., sobre todo por la gestión y disposición de recursos para el desarrollo del proyecto realizado.

Al Dr. Omar González y al Dr. Mariano Jesús García, por su importante colaboración en desarrollo del este proyecto, además de su revisión, retroalimentación y evaluación a lo largo de mi estancia de doctoral.

A la Dra. Diana Patricia Portales, por sus revisiones y evaluación durante todo el proyecto de doctorado.

Al Dr. Mauricio Comas, por sus observaciones, importante apoyo en el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Dania Olivia Govea por su gran colaboración y ayuda técnica. A los compañeros con quienes colabore durante toda mi estancia doctoral y quienes contribuyeron con su entusiasmo, esfuerzo y apoyo para el progreso de los diferentes temas desarrollados. Pablo Antonio González, Karen Paulina Elías, Diana Gisselle Alvarado, Andrea Arenas, Claudia Almendarez, Claudia Elizabeth Ruíz, Alejandra Wong, Laura Vázquez Ayala y Eduardo Gaytán.

Agradecimientos Personales.

A mis abuelos y a mis padres ejemplo para mí de perseverancia, amor, constancia y responsabilidad, quienes me han dado su confianza, ánimos y gran apoyo para emprender este proyecto.

A mis hermanas, Elena, Paty, Lucero y Chayo. Quienes comparten conmigo sus ánimos, me dan su apoyo y cariño. Mención en especial para mi compañera de vida, cómplice y quien es ahora mi familia, Laura De La Cruz. A quien agradezco su valentía y gran apoyo día a día.

Finalmente, a Teresa Neri, Karely Arjona y Gonzalo A Karina Robledo, Mariel Domínguez, y a los integrantes del café filoso: Francisco Lino y Hugo C., Karla Gaspar, Mayra Cecilia y a Liss quienes me dieron cobijo y amistad en San Luis Potosí.

Finalmente, agradezco de forma importante a la serenidad, el ejercicio, la disciplina y la resiliencia. Elementos que me apoyaron a vivir lejos mi familia nuclear aún con la sensación de una amenaza constante, a lidiar con la angustia de la incertidumbre, me guiaron cuidar más de mi salud, replantear mis prioridades y aprovechar la oportunidad que se planteó con la amenaza como lo fue la pandemia de COVID-19.

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LTB-RBD: ANTÍGENO POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA SARS-COV-2 EN MUCOSAS

INDICE

1.	Introducción	6
2.	Objetivos	9
3.	Resultados	9
4.	Conclusiones	25
5.	Artículo completo	26

AVANCES ACTUALES EN EL ÁREA DE BIOFARMACEUTICOS FABRICADOS CON ALGAS

6.	Introducción	44
7.	Objetivos	47
8.	Resultados	47
9.	Conclusiones	66
10.	Artículo completo	76

PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE LTB-RBD: ANTÍGENO POTENCIAL PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS CONTRA SARS-COV-2 EN MUCOSAS

1. Introducción

Palabras clave: adyuvante de mucosas; respuesta humoral; antígeno quimérico; vacuna de mucosas; COVID-19; Anticuerpos.

Los coronavirus son un grupo de virus de ARN monocatenario de sentido positivo que se caracterizan por poseer de las mayores extensiones y estabilidad. Estos virus pertenecen a la familia *Coronaviridae* y se agrupan en cuatro géneros: alfa-, beta-, gamma- y delta-coronavirus. De estos, solo los coronavirus (CoV) alfa y beta pueden infectar a los humanos. La mayoría de los virus que pertenecen a estos dos géneros pueden causar el "resfriado común" (por ejemplo, CoVNL63 y CoV-HKU1). No obstante, tres cepas pueden causar infecciones graves: SARS-CoV, SARS-CoV-2 y MERS-CoV, de síndrome respiratorio agudo (SARS) y de medio oriente (MERS), respectivamente. La aparición de SARS-CoV y MERS-CoV, que tienen una tasa de mortalidad significativamente mayor que SARS-CoV-2, llevó al desarrollo de algunas vacunas. Sin embargo, la mayoría de estos esfuerzos no resultaron en vacunas autorizadas, tal vez debido a la transmisión limitada de persona a persona que permitió su contención exitosa. Además, algunas vacunas contra SARS-CoV produjeron un efecto adverso grave: la infección con amplificación dependiente de anticuerpos (ADE) en individuos vacunados [1–3]. En el caso de SARS-CoV, este fenómeno se ha asociado con vacunas basadas en la proteína de espícula (S) completa. La mayoría de las vacunas evaluadas en ensayos clínicos se formularon con virus inactivados o vivos atenuados. Desafortunadamente, los altos niveles de transmisión de persona a persona para SARS-CoV-2 han dado lugar a un escenario completamente diferente en comparación con las epidemias por SARS-CoV y MERS-CoV. La escala y la duración de la pandemia por SARS-CoV-2 dieron lugar a la interrupción de la mayoría de las actividades a nivel mundial, causando efectos devastadores y duraderos que tardarán décadas en superarse.

La pandemia de COVID-19 ha dado lugar a un extraordinario esfuerzo mundial para desarrollar de forma acelerada nuevas vacunas, rápidas y seguras contra SARS-CoV-2 [4]. Llama la atención que ninguna de las vacunas aprobadas se ha basado en las tecnologías utilizadas para SARS-CoV [5], sino que se trata de tecnologías que han estado en preparación durante bastante tiempo [6]. Las vacunas de Moderna - NIH y Pfizer - BioNTech se basan en ARNm encapsulados en lípidos y polímeros que resultan en la expresión de la forma de profusión de la proteína de espícula (S). Por el contrario, del resto de las vacunas aprobadas (es decir, AstraZeneca-Oxford, CanSino, Johnson & Johnson y la del Instituto Gamaleya) se basan en vectores adenovirales [7-9]. La vacuna de Sinovac está formulada con el virus inactivado [10]. La eficacia de estas vacunas varía entre el 60 y 98 % [11]; pero, la aparición de variantes con mutaciones en la proteína S (por ejemplo, B.1.1.7, B.1.315 y P.1) ha supuesto un decremento en su eficacia. Además, el uso de vacunas basadas en adenovirus (AdV5 y AdV26) tiene el inconveniente de que la eficacia de la vacuna disminuye en los países con una alta prevalencia de estos virus [12,13]. Finalmente, varias vacunas basadas en subunidades (proteínas recombinantes) han sido aprobadas en múltiples países [14].

Escherichia coli constituye una plataforma robusta y convencional para la producción de biofarmacéuticos que puede transferirse fácilmente de un laboratorio académico a una instalación de fabricación [15]. Este sistema de expresión se puede escalar fácilmente, y los aspectos regulatorios de la producción han estado vigentes durante mucho tiempo, de modo que se consideran estandarizados. Las vacunas de subunidades recombinantes tienen la ventaja de no contener un organismo patógeno (viral o bacteriano), son de composición definida y se pueden producir utilizando diferentes plataformas y procesos de fermentación; además, su producción a gran escala es relativamente simple y rentable, y el antígeno pueden modificarse fácilmente mediante ingeniería genética [16-18]. Es importante señalar que, contrariamente a las vacunas vivas atenuadas, inactivadas o aquellas basadas en vectores virales, el nivel de bioseguridad requerido para la expresión de las vacunas de subunidades

recombinantes es mínimo, por lo que su costo puede ser significativamente menor. Además, no hay riesgo de que la vacuna resulte en una infección viral debido a procedimientos defectuosos de fabricación. Sin embargo, las vacunas de subunidades aún deben superar algunos desafíos; por ejemplo, generalmente se requieren dosis múltiples debido a una baja inmunogenicidad en comparación con las vacunas de virus completos. Un enfoque para mejorar la inmunogenicidad consiste en fusionar (genética o químicamente) el antígeno de interés con una subunidad proteica altamente inmunogénica de bacterias, por ejemplo, la subunidad B de enterotoxina termolábil de *E. coli* (LTB, *heat-labile enterotoxin B subunit*) [19,20] o la subunidad B de la toxina del cólera (CTB, *cholera toxin B subunit*). Un reto importante a la hora de expresar proteínas recombinantes en bacterias es obtener el antígeno en el estado correctamente plegado; es decir, evitar que la proteína expresada genere cuerpos de inclusión dado que esto requiere una etapa de solubilización y el repliegue de proteínas a su estado nativo y funcional. Este problema se puede resolver fusionando el antígeno a una proteína acarreadora que aumenta la solubilidad del antígeno (por ejemplo, SUMO) [21], aunque este enfoque requiere un paso posterior para removerla del antígeno durante el proceso de producción. No obstante, un diseño racional de proteínas que tenga en cuenta los protocolos de fermentación y purificación, la estructura secundaria y terciaria del antígeno objetivo, la cantidad y distribución de aminoácidos hidrofóbicos y las secuencias que pueden ser reconocidas por la bacteria puede aumentar en gran medida la solubilidad del antígeno en la célula [22-24]. Teniendo en cuenta que las vacunas actuales contra COVID-19 se administran por vía intramuscular y que la infección por virus se asocia con una inducción deficiente de las respuestas de IgA de la mucosa, existe una necesidad urgente de explorar nuevos enfoques de vacunación centrados en la inducción de respuestas efectivas en mucosas. Un enfoque para lograr este objetivo es el desarrollo de vacunas nasales u orales, las cuales estimulan eficazmente el sistema inmunitario de la mucosa en el sitio de administración e incluso en compartimentos distantes. Es bien sabido que la inmunización oral resulta en el procesamiento de antígenos en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *gut-associated lymphoid tissue*), con la posterior

inducción de respuestas IgA en intestino, pero también en pulmones gracias a la conexión funcional que existe en el sistema inmune de mucosas [25].

En el escenario actual, las vacunas de mucosas pueden servir como refuerzos de la inmunidad inducida por las vacunas administradas por vía parenteral. Dado que la subunidad B de la enterotoxina *E. coli* se reconoce como un potente adyuvante de mucosas, en este estudio se produjo y evaluó una proteína quimérica denominada LTB-RBD, basada en este portador y un segmento del dominio de unión del receptor (RBD, *receptor-binding domain*) que posee epítomos de células T y B. Se realizó la producción en *E. coli* de LTB-RBD y su purificación, y se generó evidencia de su potencial inmunogénico por vía parenteral y de mucosas.

2. Objetivos. Desarrollar una metodología de producción antígenos de origen viral en *Escherichia coli* en escala biorreactor como una estrategia que ahorre tiempo, sea eficaz y de bajo costo con el fin producir un candidato a vacuna contra SARS-CoV-2.

3. Resultados

La proteína quimérica LTB-RBD consiste en el acarreador LTB y un segmento de RBD (secuencia de aminoácidos 439–504 de la proteína S). Se eligió la secuencia de RBD porque es antígeno crucial para la inducción de respuestas humorales y celulares. En este estudio, se exploraron dos construcciones basadas en el RBD de la secuencia de Wuhan y la VOC Delta. La principal diferencia entre la variante Delta y las secuencias de Wuhan son dos cambios de aminoácidos: arginina (R142) en lugar de leucina (L142) y lisina (K168) en lugar de treonina (T168). Las secuencias se modelaron usando el programa Phyre2 para determinar la estructura secundaria. El análisis in silico no predijo cambios radicales en la estructura secundaria entre la secuencia de Wuhan y la variante Delta debido a estos cambios de aminoácidos (Figuras 1 y 2). La expresión de LTB-RBD se evaluó en matraz usando el sistema Rosetta-pET21b (+) utilizando IPTG 0.1 mM en dos tiempos de inducción (4 y 7 h). El análisis de los resultados por SDS-PAGE reveló la presencia de una proteína de 21 kDa en los cultivos de ambas variantes inducidas. Esta proteína estaba ausente tanto en los

cultivos de preinducción como en los cultivos silvestres (WT), coincidiendo con el peso molecular teórico para la forma madura de la secuencia LTB-RBD Wuhan (20.5 kDa), ya que el peso molecular de la proteína que comprende el péptido señal es de 22.9 kDa (Figura 3). La LTB-RBD recombinante se detectó tanto en la fracción soluble como en la insoluble con una abundancia similar en ambas. En cuanto a la construcción Delta LTB-RBD, se obtuvieron hallazgos similares en términos de expresión en cuerpos de inclusión y rendimientos de proteína recombinante en extractos crudos (datos no mostrados). Sin embargo, en este caso, no se observó proteína recombinante soluble.

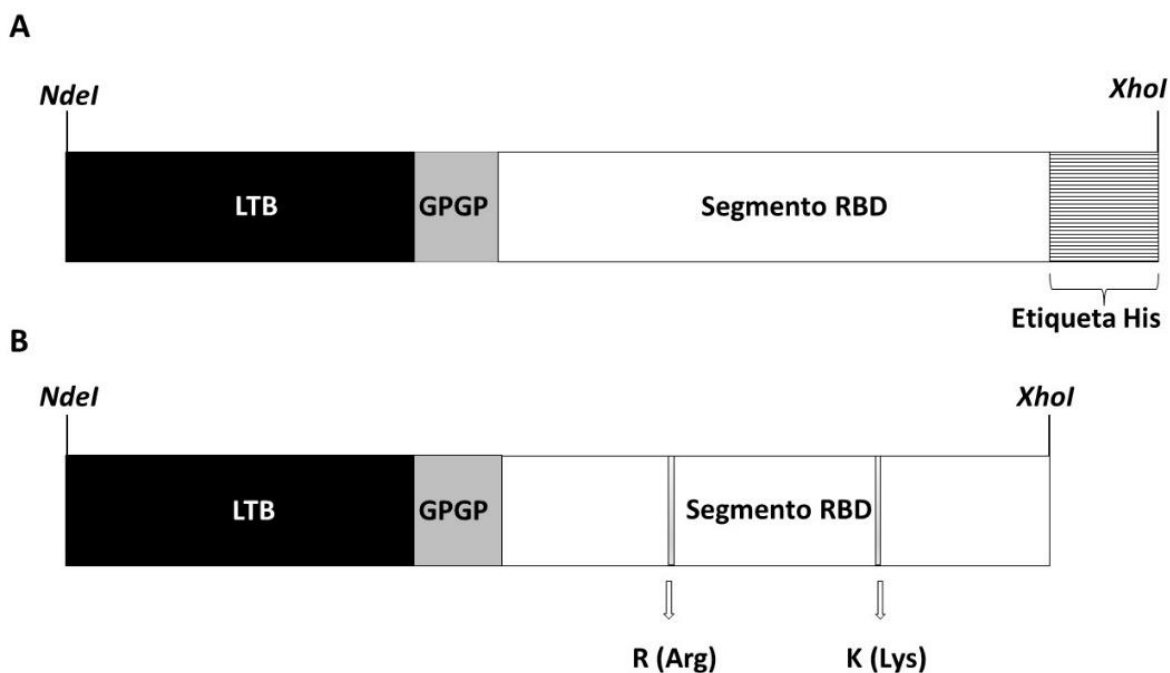


Figura 1. Representación esquemática de las proteínas quiméricas evaluadas en este estudio. (A) Esquema de la proteína quimérica LTB-RBD Wuhan. (B) Esquema de la proteína quimérica LTB-RBD variante Delta. Las proteínas de fusión comprenden la secuencia completa de LTB (en negro), un conector GPGP (en gris), un segmento del RBD del SARS-CoV-2 (439–504 aa, que contiene epítopos de células B y T, en blanco) y etiqueta de Hexa-histidina (en franjas horizontales). La construcción de la variante Delta tiene dos cambios de aminoácidos arginina (R142) en lugar de leucina (L142) y lisina (K168) en lugar de treonina (T168). Los sitios de restricción *NdeI* y *XhoI* se colocaron en los extremos 5' y 3', respectivamente, para facilitar la subclonación en el vector pET 21b (+)

A



B



Figura 2. Modelo estructural 3D del candidato a vacuna LTB-RBD Wuhan (A) o variante Delta (B). La secuencia completa de LTB (rojo) fusionada con un segmento RBD (439–504 aa, verde). Conector GPGP (amarillo) colocado entre los dominios LTB y RBD. La etiqueta His solo está presente en LTB-RBD Wuhan. Estas estructuras fueron modeladas con el programa Phyre2.

Dado que la lactosa es un inductor más conveniente (menor costo y toxicidad) que el IPTG, la producción de LTB-RBD se evaluó usando 15 g/L de lactosa como inductor [28]. El análisis SDS-PAGE reveló que la proteína de interés se expresó a niveles similares sin una variación importante en la solubilidad (Figura 3). Para confirmar la antigenicidad del LTB-RBD producido por *E. coli*, se realizó un Western blot usando un anticuerpo anti-His o un suero hiperinmune anti-CTB. Todos estos análisis revelaron una proteína inmunorreactiva del mismo peso molecular que coincidía con la proteína diferencial detectada en el análisis SDS-PAGE, confirmando la identidad y la actividad antigénica de las secuencias LTB y RBD (Figuras 4 y 5).

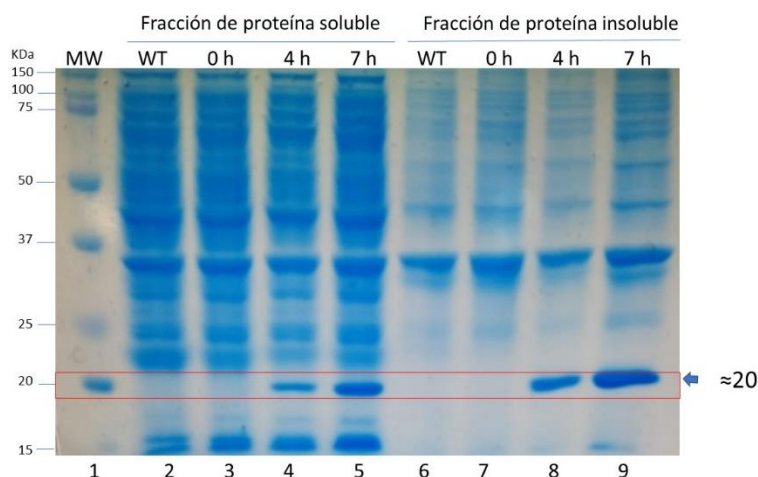


Figura 3. Análisis SDS-PAGE de extractos proteicos de los cultivos que expresan LTB-RBD Wuhan inducidos durante 4 y 7 h a 28 °C con lactosa (carriles 2 a 5: fracción de proteína soluble y carriles 6 a 9: fracción de proteína insoluble). Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 y 6: WT, cultivos no transformados inducidos, carriles 3 y 7: cultivos no inducidos, carriles 4 y 8: cultivos inducidos durante 4 h, y carriles 5 y 9: cultivos inducidos durante 7 h.

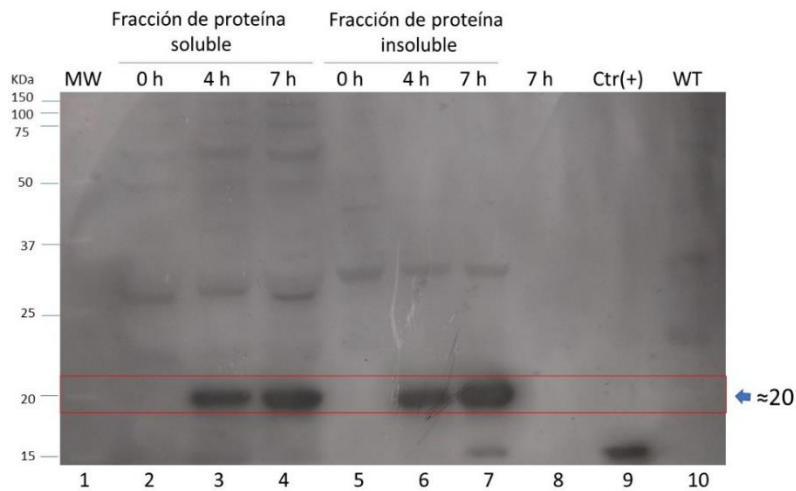


Figura 4. Análisis por Western blot para LTB-RBD Wuhan. Se empleó un suero anti-subunidad B de la toxina del cólera (CTB) para analizar extractos proteicos de cultivos inducidos durante 4 o 7 h a 28 °C usando lactosa como inductor (carriles 2 a 4: fracción de proteína soluble y carriles 5 a 7: fracción de proteína insoluble). Carril 1: marcador de peso molecular, carriles 2 y 5: cultivos no inducidos, carriles 3 a 6: cultivos inducidos durante 4 h, carriles 4 y 7: cultivos inducidos durante 7 h, carril 8: sobrenadante del medio de cultivo, carril 9: subunidad de la toxina del cólera (CTB) utilizado como control positivo y carril 10: fracción soluble de un cultivo no transformado inducido.

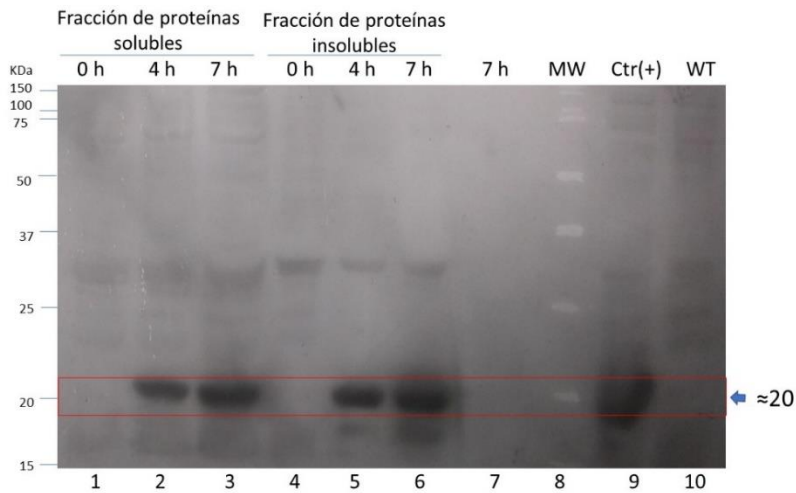


Figura 5. Análisis de Western blot para LTB-RBD Wuhan utilizando anti-His tag de extractos proteicos de cultivos inducidos durante 4 o 7 h a 28 °C con lactosa como inductor (carriles 1 a 3: fracción de proteína soluble y carriles 4 a 6: fracción de proteína insoluble). Carriles 1 y 4: cultivos no inducidos, carriles 2 y 5: cultivos inducidos durante 4 h, carriles 3 y 6: cultivos inducidos durante 7 h, carril 7: sobrenadante del medio de cultivo, carril 8: marcador de peso molecular, carril 9: proteína RBD como control positivo y carril 10: fracción soluble de un cultivo no transformado inducido.

La producción de LTB-RBD se escaló a un volumen de 1.0 L en biorreactor usando lactosa como inductor. El análisis de las fracciones de biomasa colectadas durante un período de 9 h en la fase de post-inducción reveló que la producción de proteínas recombinantes alcanzó su punto máximo a las 6 h después de la inducción y se mantuvo en un nivel similar en el punto final (9 h post-inducción, Figura 6). En términos de solubilidad, se observó un cambio con respecto a las fermentaciones en matraz, con un incremento en la abundancia de la proteína en la fracción insoluble. La biomasa mostró un incremento constante con una densidad máxima de 7.5 g/L ($OD_{600\text{ nm}} = 3.0$) alcanzada en el punto final (Figura 6.A), Durante el cultivo el pH se mantuvo en 7.0 ± 0.5 y la saturación de O₂ se mantuvo por encima de 40 % mediante agitación del cultivo (400–600 rpm) y aireación (0.5–1.5 L/min). La temperatura se mantuvo a 37 °C durante el crecimiento y a 28 °C post-inducción (Figura 6.B).

El método de purificación basado en IMAC permitió obtener LTB-RBD Wuhan pura con rendimientos promedio de 1.2 mg por litro de cultivo (Figura 7). En cuanto a la construcción Delta LTB-RBD, el método de purificación basado en IMAC seguido de cromatografía de intercambio aniónico permitió alcanzar rendimientos de 3.5 mg de LTB-RBD pura por litro de cultivo (1.4 mg de proteína por g de biomasa fresca, Figura 8). En la Figura 9, se presenta un resumen de los protocolos implementados para las dos versiones del LTB-RBD producida en este proyecto.

La inmunogenicidad de LTB-RBD se evaluó en ratones sometidos a dos dosis de vacuna administradas por vías distintas. La evaluación de los niveles de IgG anti-S reveló que se indujeron respuestas significativas de IgG en el grupo inmunizado vía s.c., con mayor respuesta en el grupo de dosis alta (títulos promedio de 1600 para el grupo de 10 µg LTB-RBD + Al(OH)₃ y 800 para el grupo de 5 µg LTB-RBD + Al(OH)₃). Curiosamente, el grupo inmunizado por vía oral con 10 µg de LTB-RBD + CT tuvo un valor de título de 1600, mientras que la formulación que carecía del adyuvante de CT mostraba un título de anticuerpos muy bajo. Por el contrario, la inmunización nasal no logró inducir respuestas de IgG relevantes, independientemente del uso de CT como adyuvante (Figura 10A).

Con respecto a la respuesta inmune de mucosas, las mediciones de IgA en saliva (enjuagues bucales) revelaron que se indujeron niveles significativos en los grupos inmunizados por vía nasal, independientemente del uso de CT como adyuvante y en el grupo inmunizado por vía s.c. que recibió la dosis alta de antígeno (Figura 10B). Las respuestas de IgA intestinal se evaluaron midiendo los niveles de IgA en las heces, mostrando que solo los grupos inmunizados por vía nasal presentaron una respuesta significativa, independientemente del uso de CT como adyuvante (Figura 10C).

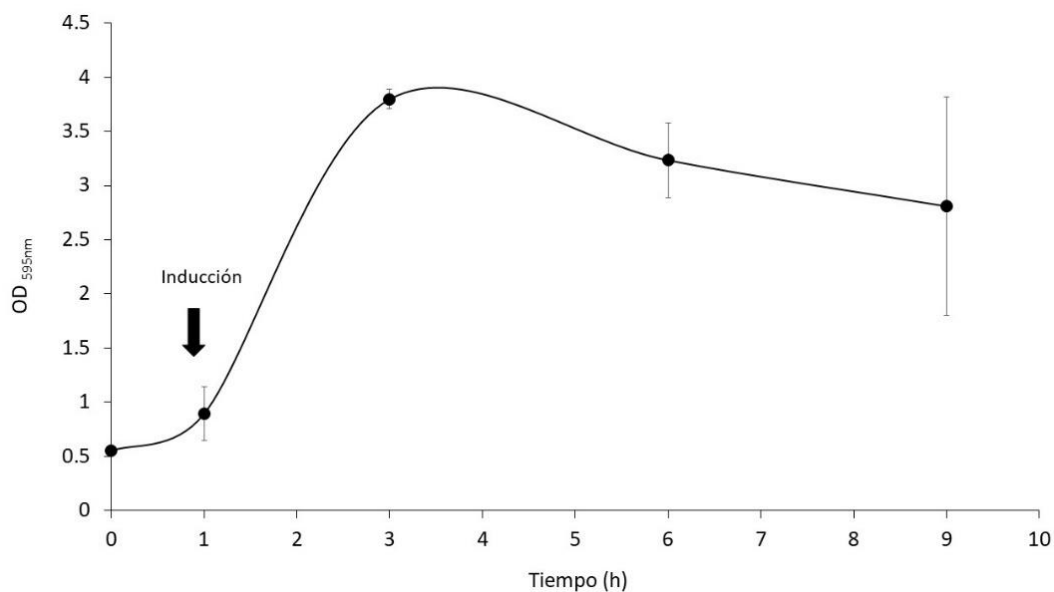


Figura 6A. Cinética para la fermentación en un biorreactor de 1.5 L. El antígeno LTB-RBD Wuhan se produjo en cultivos por lote cultivados en un fermentador de 1.5 L (ez-Control 56,156, Applikon Biotechnology) que contenía 1 L de medio LB más antibióticos.

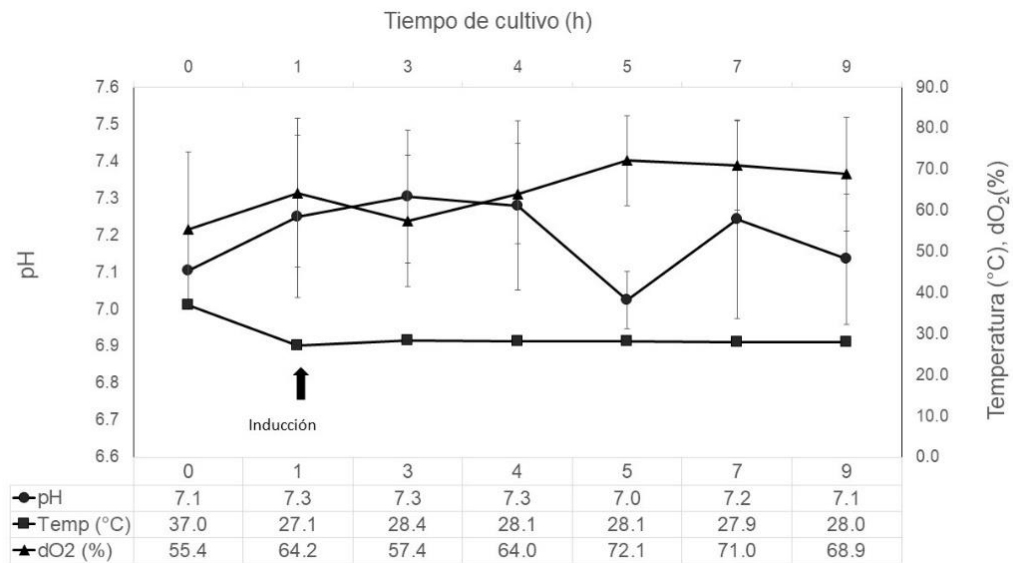


Figura 6B. Parámetros de pH, oxígeno disuelto dO₂ (%) y temperatura durante el cultivo. El pH se mantuvo en 7.0 ± 0.5 y la saturación de O₂ se mantuvo por encima de 40 % mediante agitación del cultivo (400–600 rpm) y aireación (0.5–1.5 L/min). La temperatura se mantuvo a 37 °C durante el crecimiento y a 28 °C post-inducción.

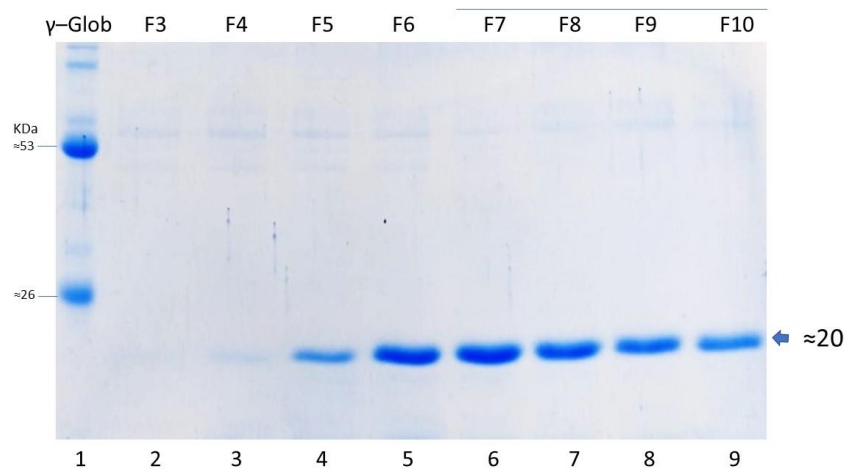
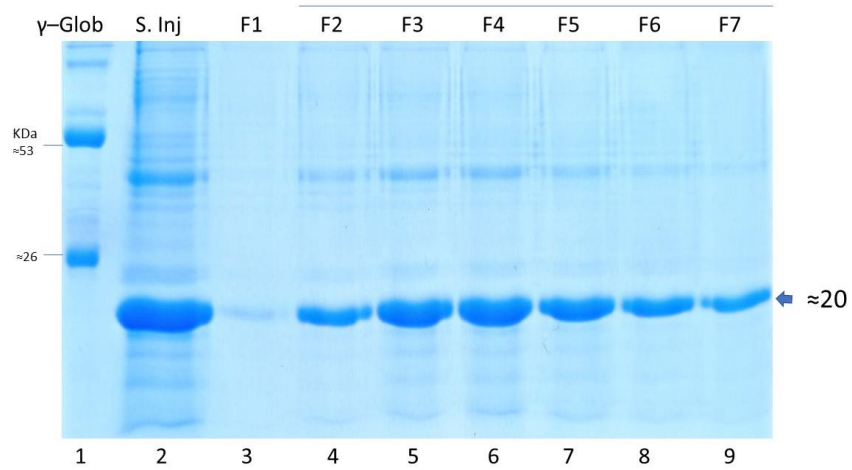


Figura 7. Análisis SDS-PAGE de las fracciones de elución durante la purificación mediante IMAC de LTB-RBD Wuhan. Carril 1: globulina y humana como marcador de peso molecular, carriles 2 a 9: fracciones eluidas tras la entrada de imidazol para la desorción de proteínas.

A)



B)

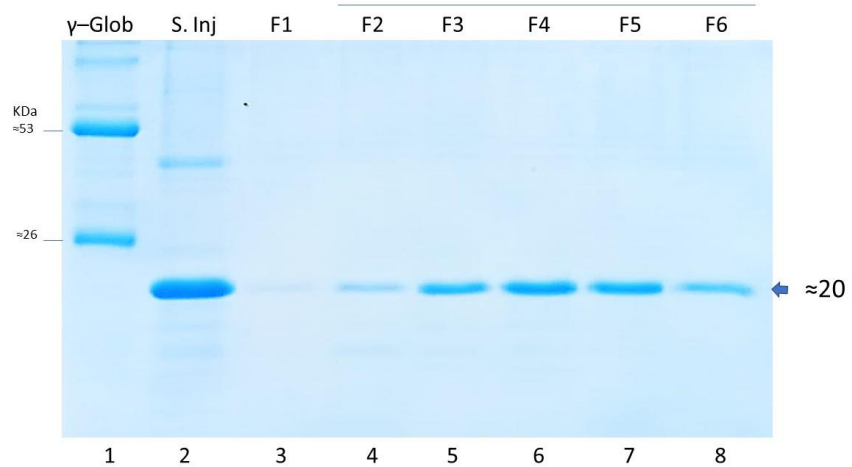


Figura 8. (A) Análisis SDS-PAGE de fracciones eluidas durante la purificación mediante IMAC de la variante Delta LTB-RBD. Carril 1: globulina γ humana como marcador de peso molecular, carril 2: muestra inyectada en la columna IMAC, carriles 3 a 9: fracciones eluidas de proteínas no adsorbidas. (B) Análisis SDS-PAGE de fracciones de elución durante la cromatografía de intercambio aniónico. Carril 1: globulina γ humana como marcador de peso molecular, carril 2: muestra inyectada en columna aniónica y carriles 3 a 8: fracciones eluidas de proteínas no adsorbidas.

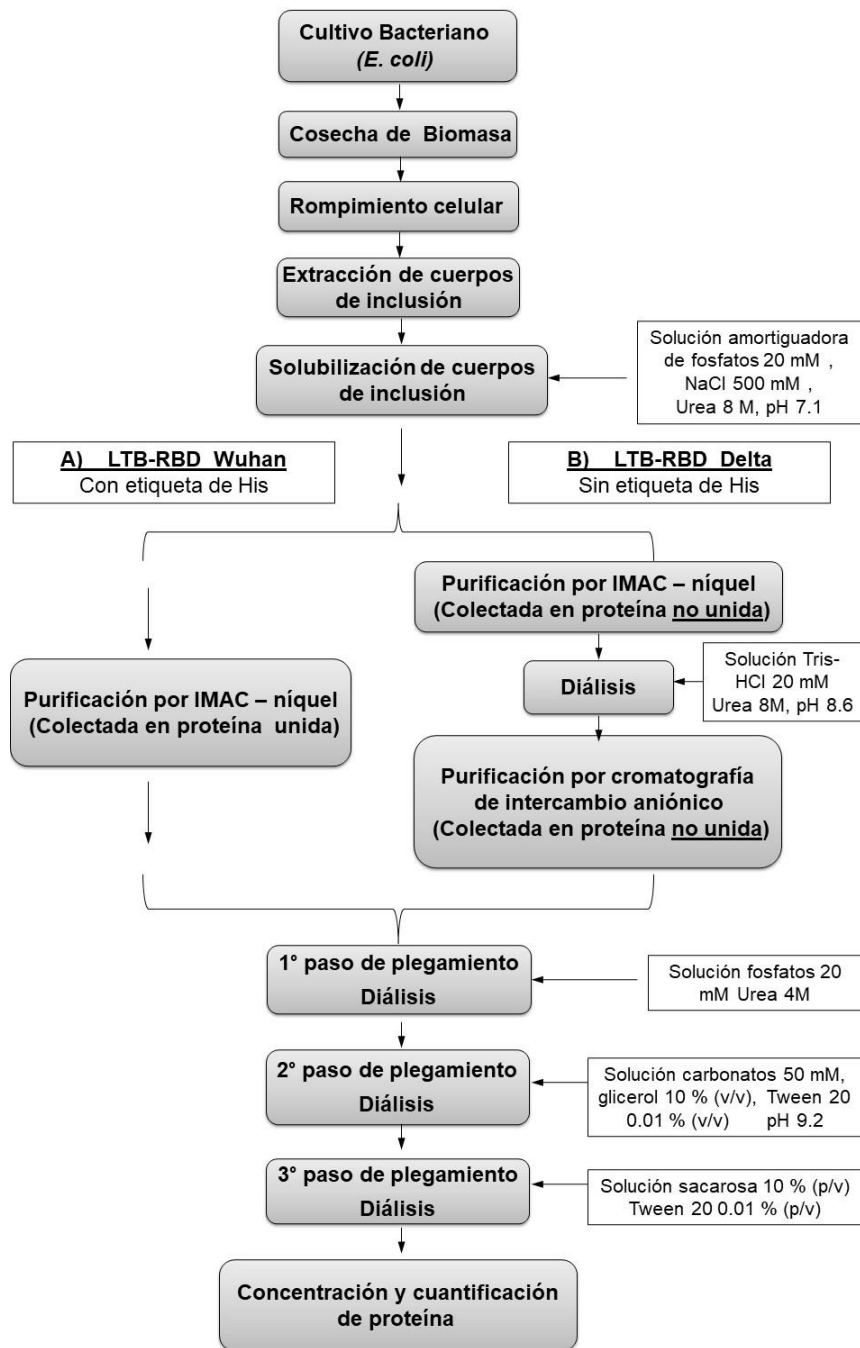
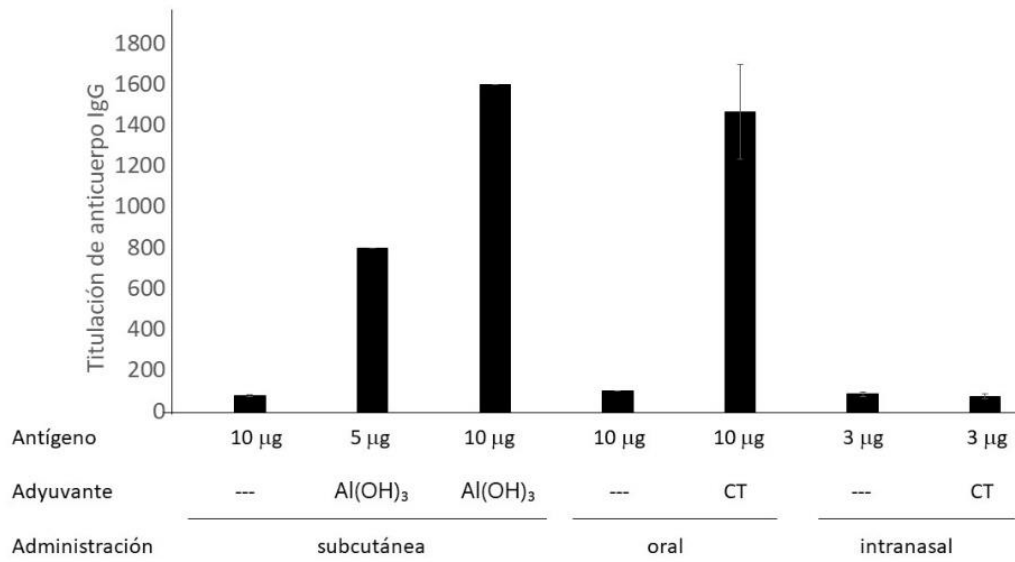
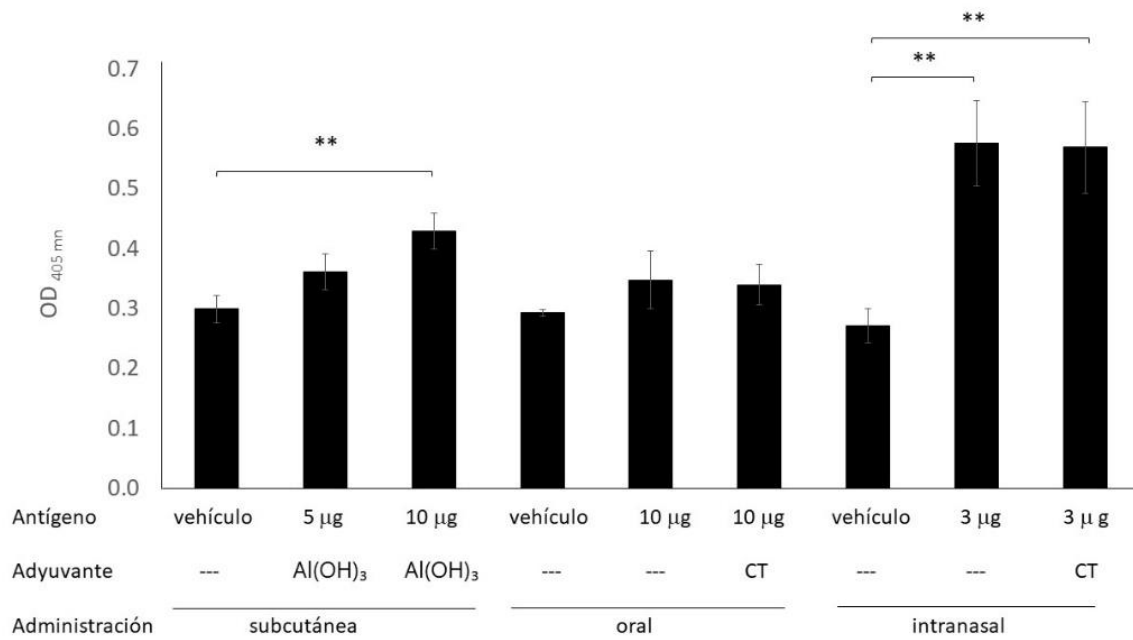


Figura 9. Descripción de los pasos seguidos en la metodología implementada para la purificación de antígenos LTB-RBD. (A) Flujo de trabajo de purificación para LTB-RBD Wuhan, que porta una etiqueta His. (B) Flujo de trabajo de purificación para LTB-RBD Delta, que carece de etiqueta His.

A)



B)



C)

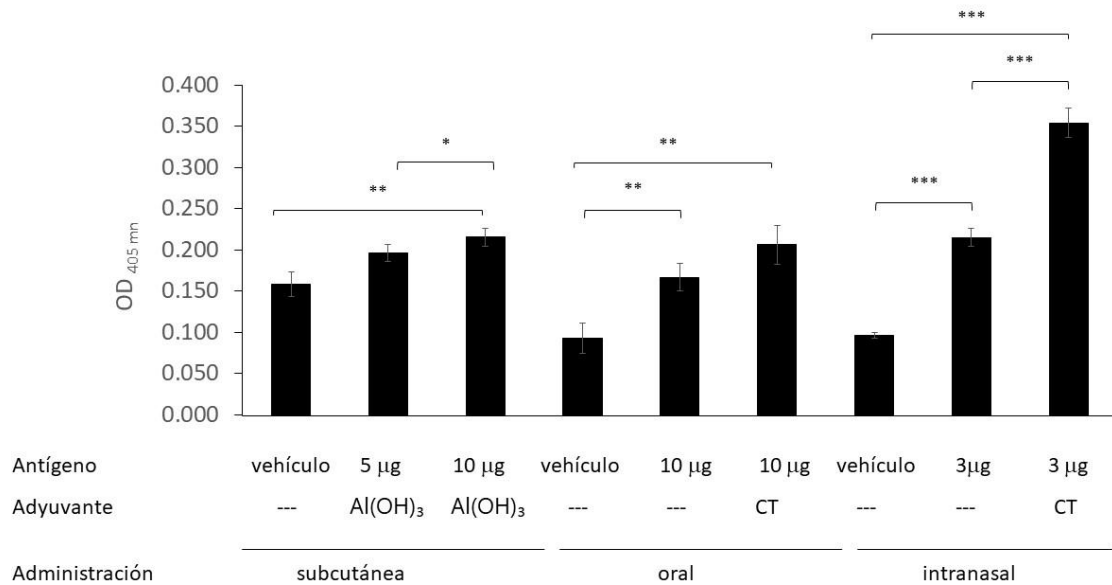


Figura 10. Respuesta humoral inducida por LTB-RBD en ratones BALB/c, n = 4, de 12 semanas de edad. (A) Títulos séricos de IgG anti-S. (B) Niveles de IgA anti-S determinados en enjuagues bucales. (C) Niveles de IgA anti-S determinados en heces. Los anticuerpos se midieron por ELISA utilizando la proteína S como antígeno diana. Las muestras se recogieron el día 27. Las barras de error son la desviación estándar del valor medio de absorbancia. Los asteriscos indican diferencias significativas (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) respecto las condiciones de prueba de la misma vía de administración y a su grupo de control (vehículo).

3.2. Discusión

En el presente estudio se produjo y purificó LTB-RBD (una proteína quimérica que contiene un acarreador adyuvante de la mucosa (LTB) y un segmento del RBD del SARS-CoV-2) para la formulación de vacunas de aplicación vía mucosas contra COVID -19. El candidato LTB-RBD se expresó como cuerpos de inclusión, lo cual fue similar a lo reportado por Jegouic *et al.*, quien evaluó la expresión de fragmentos de la proteína S de SARS-CoV-2 que parcialmente abarcan la secuencia del RBD; a pesar

de que la expresión de los cultivos de los fragmentos se realizó a temperaturas bajas (15 °C) y con diferentes concentraciones de IPTG, las proteínas formaron cuerpos de inclusión [29]. Así mismo, se ha reportado que la LTB recombinante se produce principalmente como cuerpos de inclusión en *E. coli* [30,31]. El antígeno LTB-RBD acumulado como cuerpos de inclusión se sometió a procedimientos de solubilización, purificación y plegamiento. La presencia de urea en el procedimiento de solubilización permitió purificar el candidato LTB-RBD Wuhan utilizando IMAC con iones Ni²⁺. Se probó el plegamiento de la proteína en columna, pero los resultados no fueron favorables ya que la proteína precipitó dentro de la columna tras la eliminación de la urea. Una vez que el candidato a vacuna se desorbió usando imidazol, las fracciones eluidas que contenían proteína altamente pura se sometieron a plegamiento mediante diálisis. Se evaluaron varias soluciones amortiguadoras para lograr el plegamiento y la secuencia de soluciones amortiguadoras que permitió plegar con éxito la proteína fue: solución 1 (PBS + urea 4 M a pH 7.1), solución 2 (carbonato 50 mM + glicerol al 10 % (v/v) + Tween-20 0.01 % (v/v) a pH 9.2) y solución 3 (sacarosa 10 % (p/v) + Tween-20 0.10 % (v/v)) (Tabla 1). Se eliminó el uso PBS como solución final ya que indujo precipitación de la proteína.

Tabla 1. Concentración de proteína tras el tercer paso del protocolo de plegamiento

Segundo Paso de plegamiento				
Formulación	Na ₂ CO ₃ 50 mM, Glicerol 10 % (v/v), Tween-20 0.01 % (v/v), pH 9.2			
Concentración de proteína (µg/mL)	18.23			
Recuperación de Proteína	100 %			
Tercer Paso de plegamiento				
Formulación	PBS 1×, Tween-20 0.01 % (v/v)	PBS 1×	Fosfato 10 mM, sacarosa 9 % (w/v), Tween-20 0.01 % (v/v), pH 7.0	Sacarosa 10 % (w/v), Tween-20 0.01 % (v/v)
Concentración de proteína (µg/mL)	4.57	0	2.09	15.30
Recuperación de Proteína (%)	25	0	11	87

Estudios realizados con secuencias de SARS-CoV revelaron que el RBD producido en *E. coli* es antigénico e inmunogénico, aunque en menor magnitud que el expresado en

células de mamíferos; en dicho estudio no se reportan los rendimientos [32]. RBD también se ha expresado fusionado a un péptido que mejora la solubilidad (SEP, *solubility-enhancing peptide*), péptido que se constituye de nueve residuos de arginina, lo que resultó en una mejor acumulación de RBD soluble. Esta versión de RBD se produjo con rendimientos de hasta 2 mg/L, reconoció el receptor ACE2 e indujo anticuerpos capaces de interactuar con una proteína S1 producida en mamíferos [33]. Otro caso es el reporte de McGuire *et al.* [34], en el que se diseñaron proteínas de fusión basadas en el acarreador llamado CBM9 y diferentes segmentos de la proteína S. Entre las proteínas analizadas, la denominada CBM9-ID-H1, que contiene los aminoácidos 540–588 de la proteína S, se produjo con rendimientos de hasta 122 mg/L de proteína pura, la cual fue ampliamente reactiva con los sueros de individuos convalecientes de COVID-19, lo que sugiere que retiene los determinantes antigénicos y por lo tanto se propone como un inmunógeno prometedor. Estos estudios respaldan el uso de *E. coli* para producir antígenos funcionales de SARS-CoV-2, un sistema que ofrece un costo de producción más bajo en comparación con las plataformas basadas en células de mamíferos.

La actividad funcional de LTB-RBD obtenida en este estudio se evaluó inicialmente en ratones sometidos a dos inmunizaciones por diferentes vías (subcutánea, oral y nasal). Debido a que los sueros de ratones s.c. que recibieron el antígeno LTB-RBD (10 µg) más hidróxido de aluminio como adyuvante mostraron respuestas séricas significativas de IgG anti-S (y respuestas moderadas IgA anti-S en saliva), se considera que este antígeno tiene un potencial prometedor para inducir anticuerpos neutralizantes contra SARS-CoV-2. En virtud de que LTB-RBD fue capaz de inducir respuestas de IgG sistémicas y respuestas moderadas de IgA en los compartimentos mucosos evaluados cuando se administró por vía s.c., pero indujo bajos niveles séricos de IgG y altas respuestas de IgA cuando se administró por vía i.n., proponemos esa combinación de las vías de administración en el esquema de inmunización (es decir, una tercera dosis i.n. de refuerzo en el grupo inmunizado s.c.) esta estrategia podría conducir a una respuesta inmunitaria óptima que incluya respuestas humorales robustas tanto a nivel

sistémico como de mucosas. Estos hallazgos justifican ampliar la caracterización de LTB-RBD para evaluar la respuesta celular que induce y realizar ensayos de neutralización para determinar el potencial inmunoprotector de estos candidatos vacunales. Actualmente, siete vacunas anti-SARS-CoV-2 intranasales han alcanzado la evaluación clínica y la mayoría de estos desarrollos se basan en vectores virales o virus vivos atenuados [35]. La administración oral de vacunas para SARS-CoV-2 también se ha explorado. Por ejemplo, Jawalagatti et al. [36] reportó una cepa de *Salmonella* que media la entrega un replicón que codifica para RBD, HR, M y epítomos de nsp13 (ARN helicasa), el cual indujo con éxito inmunidad protectora en modelos de infección por SARS-CoV-2 basados en ratones y hámsteres; lo que se asoció a la inducción de respuestas celulares y humorales, incluyendo la inducción eficiente de respuestas IgA en la mucosa respiratoria.

Los acarreadores inmunogénicos son esenciales cuando el antígeno diana tiene una complejidad baja y, por lo tanto, no es muy inmunogénico. LTB es un acarreador promisorio dado que tiene efectos inmunomoduladores y facilita la translocación del antígeno hacia la submucosa, además de aumentar la complejidad del antígeno. LTB se ha utilizado experimentalmente en numerosos estudios como acarreador de antígenos no relacionados, con capacidad de favorecer la inducción de respuestas humorales y linfocitos B de memoria. LTB mejora la respuesta humoral frente a antígenos fusionados genéticamente no relacionados cuando se administra por vía i.n. u oral [37,38]. A diferencia de la holotoxina LT, la LTB no es una proteína inherentemente tóxica y se ha utilizado como adyuvante en una vacuna candidata contra la diarrea por ETEC que alcanzó ensayos clínicos con resultados positivos [39]. Además, LTB también ha demostrado actividad adyuvante cuando se administra por vía parenteral [40]; por lo tanto, el diseño de un esquema de inmunización con LTB-RBD por las vías parenteral-mucosa podría inducir respuestas inmunitarias adecuadas en términos de potencia y compartimentalización, ofreciendo el potencial para prevenir la propagación del virus en etapas tempranas de la infección. La inmunización sublingual también se ha propuesto como una vía conveniente, capaz de inducir altas

respuestas inmunitarias y por tanto también merece atención el evaluar por esta vía el antígeno LTB-RBD [41]. LTB se ha utilizado como antígeno/adyuvante para formular una vacuna oral contra *E. coli* enterotoxigénica, la cual indujo anticuerpos y linfocitos B de memoria sin efectos adversos graves [42]. Con base en estos antecedentes, se eligió a LTB como el acarreador con la hipótesis de que incrementaría la inducción de respuestas inmunitarias hacia los epítomos del SARS-CoV-2 tras la administración del antígeno por vía nasal u oral. En este sentido, el desarrollo de vacunas administradas a través de mucosas no sólo representa un enfoque atractivo en términos de una administración más amigable (más aceptable por los pacientes) sino también la oportunidad de lograr la inducción de perfiles inmunológicos más atractivos, considerando que la inmunización por estas vías resulta en la inducción de respuestas inmunes en las mucosas de las vías respiratorias, lo cual es fundamental para controlar o prevenir la infección por SARS-CoV-2.

La aparición de la variante Delta adquirió una gran relevancia epidemiológica dada su marcada patogenicidad y transmisibilidad, así como su tendencia a escapar de la inmunidad inducida por la cepa de Wuhan [43]. Esto impulsó el diseño de una nueva versión del LTB-RBD con la secuencia específica de la VOC Delta. La expresión de este nuevo antígeno condujo a su recuperación como proteína insoluble con rendimientos similares a los observados para LTB-RBD Wuhan. Dados los problemas regulatorios asociados con el uso de la etiqueta His, esta nueva construcción careció de etiquetas y por tanto se estableció la estrategia de purificación para dar cuenta de un procedimiento sin etiquetas. La cromatografía de intercambio aniónico permitió purificar el antígeno LTB-RBD-Delta hasta homogeneidad. Las condiciones previamente estandarizadas para el plegamiento del LTB-RBD Wuhan nos permitieron plegar con éxito el antígeno LTB-RBD Delta con rendimientos similares con respecto al primero, lo que sugiere que los métodos desarrollados son sólidos y podrían aplicarse fácilmente a variantes nuevas. Actualmente estamos evaluando este enfoque para producir un antígeno ómicron LTB-RBD.

4. Conclusiones

El antígeno LTB-RBD, que comprende la subunidad B de enterotoxina termolábil de *E. coli* y un segmento del dominio de unión a receptor de SARS-CoV2 (residuos 439-504) es un candidato vacunal que se produjo en dos versiones: secuencia de RBD de la cepa Wuhan y secuencia de la variante de preocupación Delta. LTB-RBD se expresa eficientemente en *E. coli* recombinante mediante un sistema de expresión basado en el sistema pET. El antígeno LTB-RBD se expresa y se purifica empleando los protocolos que se desarrollaron para su purificación y plegamiento, con los siguientes rendimientos: 1.2 mg/L de cultivo para la secuencia de la cepa Wuhan y 3.5 mg/L de cultivo para la variante Delta. El porcentaje de recuperación fue de 87 % en la solución de sacarosa al 10 % (w/v), Tween 20 al 0.01 % (v/v), que se aplica en el tercer paso de plegamiento, resultando en la condición que promueve la mayor estabilidad de la proteína. La proteína LTB-RBD obtenida es inmunogénica en ratones BALB/c cuando se administra vía subcutánea en combinación con hidróxido de aluminio como adyuvante, generando respuestas sistémicas robustas, pero a nivel de mucosas induce una respuesta modesta de IgA en saliva.

La proteína LTB-RBD administrada por vía nasal en combinación con CT como adyuvante o sola induce niveles significativos en las respuestas humorales de IgA anti-espícula en saliva, mientras que los niveles de IgA en que se registran en heces es muy significativo en la administración con el adyuvante y disminuye al usar la proteína sola. Este hallazgo genera la perspectiva de establecer esquemas de inmunización en los que se combinen las vías de administración (iniciar con dosis inyectables y reforzar con dosis administradas vía mucosas), con la finalidad de inducir una respuesta inmunitaria óptima, es decir, tanto sistémica como de mucosas. La plataforma de producción desarrollada para LTB-RBD ofrece un bajo costo de producción, ausencia de etiquetas y fácil adaptación a nuevas variantes, por lo que podría ser la base del desarrollo de nuevas vacunas de mucosas contra SARS-CoV-2.

Article

Production and Purification of LTB-RBD: A Potential Antigen for Mucosal Vaccine Development against SARS-CoV-2

Karla I. Solis-Andrade ^{1,2,†}, Omar Gonzalez-Ortega ^{1,2,†} , Dania O. Govea-Alonso ^{1,2},
Mauricio Comas-Garcia ^{3,4,5}  and Sergio Rosales-Mendoza ^{1,2,*}

¹ Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Dr. Manuel Nava 6, San Luis Potosí 78210, Mexico

² Sección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

³ Sección de Microscopía de Alta Resolución, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

⁴ Sección de Genómica Médica, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Sierra Leona 550, Lomas 2ª. Sección, San Luis Potosí 78210, Mexico

⁵ Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Av. Parque Chapultepec 1570, San Luis Potosí 78210, Mexico

* Correspondence: rosales.s@uaslp.mx; Tel./Fax: +52-444-826-2440

† These authors contributed equally to this work.

Abstract: Most of the current SARS-CoV-2 vaccines are based on parenteral immunization targeting the S protein. Although protective, such vaccines could be optimized by inducing effective immune responses (neutralizing IgA responses) at the mucosal surfaces, allowing them to block the virus at the earliest stage of the infectious cycle. Herein a recombinant chimeric antigen called LTB-RBD is described, which comprises the B subunit of the heat-labile enterotoxin from *E. coli* and a segment of the RBD from SARS-CoV-2 (aa 439-504, carrying B and T cell epitopes) from the Wuhan sequence and the variant of concern (VOC)—delta. Since LTB is a mucosal adjuvant, targeting the GM1 receptor at the surface and facilitating antigen translocation to the submucosa, this candidate will help in designing mucosal vaccines (i.e., oral or intranasal formulations). LTB-RBD was produced in *E. coli* and purified to homogeneity by IMAC and IMAC-anionic exchange chromatography. The yields in terms of pure LTB-RBD were 1.2 mg per liter of culture for the Wuhan sequence and 3.5 mg per liter for the delta variant. The *E. coli*-made LTB-RBD induced seric IgG responses and IgA responses in the mouth and feces of mice when subcutaneously administered and intestinal and mouth IgA responses when administered nasally. The expression and purification protocols developed for LTB-RBD constitute a robust system to produce vaccine candidates against SARS-CoV-2 and its variants, offering a low-cost production system with no tags and with ease of adaptation to new variants. The *E. coli*-made LTB-RBD will be the basis for developing mucosal vaccine candidates capable of inducing sterilizing immunity against SARS-CoV-2.

Keywords: mucosal adjuvant; humoral response; chimeric antigen; mucosal vaccine; COVID-19



Citation: Solis-Andrade, K.I.; Gonzalez-Ortega, O.; Govea-Alonso, D.O.; Comas-Garcia, M.; Rosales-Mendoza, S. Production and Purification of LTB-RBD: A Potential Antigen for Mucosal Vaccine Development against SARS-CoV-2. *Vaccines* **2022**, *10*, 1759. <https://doi.org/10.3390/vaccines10101759>

Academic Editor: Nicolaas A. Bos

Received: 26 August 2022

Accepted: 17 October 2022

Published: 20 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Coronaviruses are a group of positive-sense single-stranded RNA viruses with the largest and most stable known RNA genome. These viruses belong to the *Coronaviridae* family and are grouped into four genera: alpha-, beta-, gamma-, and delta-coronavirus. Of these four genera, only alpha- and beta-coronaviruses can infect humans. Most of the viruses that belong to these two genera can cause the “common cold” (e.g., CoV-NL63 and CoV-HKU1). However, three species can cause severe infections, leading to pneumonia and even resulting in death (i.e., SARS-CoV, SARS-CoV-2, and MERS-CoV). The appearance of SARS-CoV and MERS-CoV, which have a significantly higher mortality

rate than SARS-CoV-2, led to the development of some vaccines. However, most of these efforts did not result in licensed vaccines, perhaps due to the limited human-to-human transmission. Furthermore, some SARS-CoV vaccines produced an antibody-dependent enhancement (ADE) infection in vaccinated individuals [1–3]. In the case of SARS-CoV, this phenomenon has been associated with vaccines displaying the full-length spike (S) protein. Most of the vaccines in clinical trials were either inactivated or live-attenuated viruses. Unfortunately, the high levels of human-to-human transmission for SARS-CoV-2 have resulted in a completely different scenario from the SARS-CoV and MERS-CoV epidemics. The scale and duration of the SARS-CoV-2 pandemic resulted in a worldwide halt of most activities. In some cases, these restrictions have been in place for a year, causing devastating and long-lasting effects that will take decades to overcome.

The COVID-19 pandemic has resulted in an extraordinary worldwide effort to develop novel vaccines quickly and safely against SARS-CoV-2 [4]. Interestingly, none of the approved vaccines has been based on the technologies used for SARS-CoV [5]. Instead, most of these vaccines are based on technologies that have been in the pipeline for quite a while [6]. The vaccines from Moderna/NIH and Pfizer/BioNTech rely on mRNAs encapsulated in lipids and polymers that code for the prefusion form of the spike (S) protein. In contrast, most of the remaining approved vaccines (i.e., AstraZeneca/Oxford, CanSino, Johnson & Johnson, and Gamaleya Institute) are based on adenoviral vectors [7–9]. The vaccine from Sinovac is formulated with the inactivated virus [10]. The efficacy of these vaccines varies between 60% and 98% [11]; however, the emergence of variants with mutations in the S protein (e.g., B.1.1.7, B.1.315, and P.1) could decrease the efficacy of these vaccines. Furthermore, the use of adenovirus-based vaccines (AdV5 and AdV26) has the drawback that countries with a high prevalence of these viruses can result in populations with neutralizing antibodies against them, further decreasing the efficacy of the vaccine [12,13]. Finally, one subunit-based vaccine (Novavax) is close to being approved in North America and Europe [14].

The production of biopharmaceuticals in *E. coli* offers a robust and well-established platform that can be easily transferred from an academic laboratory to a manufacturing facility [15]. This expression system can be easily scaled up, and the regulatory aspects of the production have been in place for a long time such that they are considered standard. Recombinant subunit vaccines have the advantages of not containing a pathogenic organism (viral or bacterial), their composition is exactly known for each batch, they can be produced using different platforms and fermentation processes, large-scale production is relatively simple and cost-effective, and both the expression system and the antigen can be easily modified by genetic engineering [16–18]. It is important to point out that contrary to live-attenuated, inactivated, and viral vector-based vaccines, the level of biosafety required for the expression of recombinant subunit vaccines is lower; therefore, their overall cost can be significantly lower. Furthermore, there is no risk of the vaccine resulting in a viral infection due to defective manufacturing procedures. Subunit vaccines still must overcome some challenges. In general, multiple doses are required due to their low immunogenicity compared to the use of the whole pathogen. One approach to enhance the immunogenicity consists in fusing (genetic or chemically) the antigen of interest with a highly immunogenic protein subunit from bacteria (e.g., the *E. coli* heat-labile enterotoxin B subunit toxin [LTB] [19,20] or cholera toxin B subunit [CTB]). A major challenge when expressing recombinant proteins in bacteria is to obtain the antigen in the properly folded state, i.e., to avoid the expressed protein from generating inclusion bodies, which requires protein refolding to its native and functional state. This problem can be solved by fusing the protein with another protein that increases antigen solubility inside the cell (e.g., SUMO) [21], although this protein must be cleaved from the antigen once it is in a stable form and purified. Nonetheless, a rational protein design that takes into consideration the fermentation and purification protocols, the secondary and tertiary structure of the target antigen, the amount and distribution of hydrophobic amino acids, and the sequences that can be recognized by the bacterium can greatly increase the solubility of the antigen in the cell [22–24].

Considering that the current COVID-19 vaccines are intramuscularly administered and that the lack of prevention of virus infection is associated with a poor induction of mucosal IgA responses, there is an urgent need to explore new vaccination approaches focused on the induction of effective mucosal responses. One straightforward approach to achieving this goal is the development of nasal or oral vaccines, which effectively boost the mucosal immune system in the compartment used for vaccine delivery and even in distant compartments. It is well known that oral immunization results in GALT-mediated antigen processing with subsequent homing to pulmonary tissues in which IgA production is induced [25]. In the current scenario, such mucosal vaccines may serve as boosters of the immunity induced by parenterally-administered vaccines.

Since the B subunit of *E. coli* enterotoxin is recognized as a potent mucosal adjuvant, in this study a chimeric protein (LTB-RBD) based on this carrier and a segment of RBD targeting T and B cell epitopes is reported. The production in *E. coli* of LTB-RBD and its purification was performed, and evidence of the immunogenic potential by parenteral and mucosal routes of this chimeric protein was generated.

2. Materials and Methods

2.1. Expression Vector Design

Two synthetic genes coding for a chimeric protein called LTB-RBD Wuhan strain and VOC delta, respectively, were obtained by GenScript Inc. (Piscataway, NJ, USA), following a codon optimization process according to codon usage in *E. coli*. The sequence comprises the full-length sequence of LTB fused to aa 439–504 from the S protein. A GPGP linker was placed between the LTB and RBD moieties to facilitate displaying the target antigen. The structure of the recombinant proteins was modeled using the Phyre2 protein fold recognition server [26]. NdeI and XhoI restriction sites were placed at the 5' and 3' ends, respectively, to facilitate subcloning into pET 21b (+), in which the ORF is fused to a His tag coding sequence at the 3' end in the case of the Wuhan strain, and without His tag in the case of VOC delta. These procedures were performed following standard molecular cloning protocols. A positive clone carrying the target expression vector was confirmed by restriction profiling and conventional sequencing.

2.2. Strains, Materials, and Culture Media

The pET 21b (+)-LTB-RBD construct was transferred to the *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS host. The transformation was performed by heat shock. Afterward, the cells were shaken at 37 °C for 1 h and streaked on LB plates supplemented with ampicillin (100 mg/L) and chloramphenicol (40 mg/L). Cultivation conditions in shake flask cultures were as follows: a single positive colony was inoculated in 500 mL baffled flasks containing 100 mL of LB medium (10 g/L bacto-peptone, 5 g/L yeast extract, and 10 g/L NaCl) supplemented with ampicillin (100 mg/L) and chloramphenicol (40 mg/mL) at 37 °C and 140 rpm. To induce expression of the LTB-RBD fusion protein, cells were grown to an optical density of 0.7–1.0 at 600 nm ($OD_{600\text{ nm}}$), and lactose (15 g/L) or IPTG (0.1 mM) was added. All shake flask cultures were induced at 28 °C. Induction was maintained for 7 h, and samples were withdrawn at 0, 4, and 7 h. Cultivation conditions in batch bioreactor cultures were as follows. A seed culture was prepared in a 1 L flask containing 200 mL of LB medium, incubated at 37 °C, and 140 rpm for 16 h. The cells were harvested by centrifugation and resuspended in 20 mL of fresh LB medium. Upon inoculation of the bioreactor, an $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.4–0.5 was reached. Batch cultures were grown in a 1.5 L jar fermenter (ez-Control system model 56,156, Applikon Biotechnology, Delft, The Netherlands) containing 1 L of LB medium plus ampicillin (100 mg/L) and chloramphenicol (40 mg/L). pH was maintained at 7.0 ± 0.5 by adding 2 M HCl or 2 M NaOH, and O_2 saturation was kept above 40% by culture stirring (400–600 rpm) and aeration (0.5–1.5 L/min). The temperature was held at 37 °C. When culture density reached an $OD_{600\text{ nm}}$ of 1.0–1.5, the temperature was decreased to 28 °C, and lactose was added to reach a concentration of 15 g/L and induce expression of LTB-RBD. The batch bioreactor culture was induced for 9–12 h, and 10 mL samples

were collected at 3 h intervals. The samples and the endpoint cultures, either from flask or bioreactor fermentations, were centrifuged at 6000 rpm for 10 min at 4 °C, and the pellets were stored at −40 °C. The induced and noninduced samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and/or Western blotting.

2.3. Cell Disruption

The bacterial biomass was collected at 7000 rpm (5 min) and resuspended in a cold solution (100 mM Tris-HCl, 20% (*w/v*) sucrose, and pH 7.4). 0.2 mL of this solution was used per 20 mg of biomass. The cells were recovered by centrifugation at 7000 rpm for 15 min (4 °C). The pellet was resuspended in injectable water + 0.01 mM PMSF (0.5 mL per 20 mg of biomass). Cells were disrupted while the test tube was kept on ice by applying 6–9 cycles of 30 s on and 30 s off using ultrasonication (GEX130PB device, Twinsburg, OH, USA) at a 70% amplitude. Afterward, the suspension was centrifuged at 7000 rpm for 30 min (4 °C) to recover a pellet composed of inclusion bodies and insoluble cellular components and a supernatant (soluble protein fraction). These fractions were stored at −40 °C until further analysis.

2.4. SDS-PAGE and Western Blotting Analyses

Protein samples were mixed with 5× reducing dye buffer (500 mM DTT, 250 mM Tris-HCl, 10% (*w/v*) SDS, 50% (*v/v*) glycerol, 0.1% bromophenol blue, pH 6.8) and boiled for 10 min. Proteins were separated using a 12% denaturing polyacrylamide gel and visualized by Coomassie blue staining. For Western blot analysis, the proteins were transferred from the polyacrylamide gel to a nitrocellulose membrane (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1 h at 500 mA using an electrophoretic transfer cell (Biorad, Hercules, CA, USA). The membrane was incubated overnight in blocking buffer (5% (*w/v*) fat-free dry milk dissolved in PBS + 0.05% (*v/v*) Tween 20). The membrane was subsequently washed three times with PBS + 0.05% (*v/v*) Tween 20 and incubated with mouse anti-sera (1:1000 dilution) against either the cholera toxin B subunit (CTB), which is an in-house obtained mouse hyperimmune serum using complete Freund's adjuvant and commercial CTB from Sigma (cat. no. C9903), or a monoclonal mouse antibody (1:3000 dilution) targeting the His tag. The blots were washed and incubated with a goat horseradish peroxidase-conjugated secondary anti-IgG mouse antibody (1:2000 dilution, Sigma, Livonia, MI, USA) for 2 h at room temperature. Antigen detection was performed by incubating blots with the SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce, Rockford, IL, USA), and the signal was revealed using chemiluminescent-sensitive Kodak film (Kodak, Rochester, NY, USA).

2.5. Analytical Methods

During flask and batch cultivation, cell growth was monitored by measuring OD_{600 nm}. Protein samples were quantified with a protein Bradford assay kit (Ab 102535, Abcam, Cambridge, UK) using bovine serum albumin as standard.

2.6. Protein Purification

The insoluble fraction obtained upon cell disruption was subjected to a washing procedure (twice with PBS 1× + 1% (*v/v*) Triton X-100 and twice with PBS 1×) to remove cellular components and solubilize contaminant proteins. The washed pellet was contacted with solubilizing buffer (20 mM phosphate, 500 mM NaCl, 8 M urea, pH 7.1) overnight at 4 °C. Finally, the suspension was centrifuged at 13,000 rpm for 20 min to recover the supernatant with solubilized recombinant protein. This step was repeated twice. This supernatant is the sample used for chromatography.

For the LTB-RBD Wuhan sequence construct, which carries a His tag, IMAC was run using a 2 mL column packed with Chelating Sepharose Fast Flow (Pharmacia Biotechnology, Stockholm, Sweden). The adsorbent was charged with Ni²⁺ ions and equilibrated with binding buffer, and 1 mL of the previously obtained protein extract was injected to the

chromatographic system at a flow rate of 0.25 mL/min. After washing the column, protein desorption was accomplished by feeding the desorption buffer (20 mM phosphate, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 8 M urea, pH 7.1). Fractions containing the protein of interest were collected and subjected to a refolding process using dialysis with a 6–8 kDa MWCO membrane. The buffers used to accomplish refolding, in sequential order, were 20 mM phosphate buffer + 4 M urea at pH 7.1, 50 mM carbonate + 10% (*v/v*) glycerol + 0.01% (*v/v*) Tween at pH 9.2, and 10% (*w/v*) sucrose + 0.01% (*v/v*) Tween 20.

For the LTB-RBD delta variant construct, which lacks tags, the supernatant with solubilized protein was used for IMAC as described above; however, in this case, the fractions containing the protein of interest were collected as unbound protein (several contaminant proteins bound to the immobilized Ni²⁺ ions). After this purification step, a change in buffer (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 8 M urea, pH 8.6) was applied using dialysis to reduce the concentration of NaCl. A second purification step using anionic exchange chromatography was performed. The fractions obtained containing the recombinant protein were harvested again as unbound protein (the few contaminant proteins found after IMAC were retained by the cationic column) and dialyzed using the following buffers sequence: 20 mM phosphate buffer + 4 M urea at pH 7.1, 50 mM carbonate + 10% (*v/v*) glycerol + 0.01% (*v/v*) Tween at pH 9.2, and 10% (*w/v*) sucrose + 0.01% (*v/v*) Tween 20.

2.7. Protein Concentration

The purified protein was concentrated using powdered polyethylene glycol (PEG, MW 200,000, Sigma) or by ultrafiltration. The protein solution was transferred to a 6–8 kDa MWCO dialysis membrane, which was covered with PEG powder. After a 20 min incubation at 4 °C, the layer of hydrated PEG over the dialysis bag was removed and replaced with dry PEG. This procedure was repeated 3–5 times. As for ultrafiltration, a Vivaspin 2 column (5 kDa MWCO) was rinsed once by adding a solution composed of 10% (*w/v*) sucrose + 0.01% (*v/v*) Tween 20 and centrifuged at 4000 rpm by 10 min. Afterward, the protein solution was placed into the column and concentrated by two cycles of centrifugation of 30 min at 4000 rpm. After these steps, the concentrated protein was quantified.

2.8. Immunogenicity Assessment

The immunogenicity of LTB-RBD was assessed in BALB/c mice (n = 4, 12 weeks old), following a protocol approved by the institutional ethics committee (CEID-2020-07R1). The groups received one of the following treatments on days 1 and 14: 5 µg of LTB-RBD plus alum by subcutaneous (s.c.) route, 10 µg of LTB-RBD plus alum by s.c. route, 10 µg of LTB-RBD alone by oral (p.o.) route, 10 µg of LTB-RBD plus 1 µg of cholera toxin, 3 µg of LTB-RBD alone by intranasal (i.n.) route, or 3 µg of LTB-RBD plus 0.3 µg of cholera toxin by i.n. route. Negative control groups were treated with the antigen vehicle alone (10% sucrose, 0.01% Tween 20) by s.c., p.o., or i.n. routes. Dose volumes were the following: 300 µL for s.c., 400 µL for p.o., and 20 µL for i.n. routes. For s.c. formulations, Alum adjuvant was used at a 1:5 ratio (G Biosciences, St. Louis, MO, USA, cat no. 786-1215). Animals were slightly anesthetized with isoflurane right before immunization.

All samples were taken from all mice groups on day 27. Blood samples were withdrawn by puncture in the tail. After clot formation, samples were centrifuged at 10,000 rpm for 10 min, and the obtained sera were stored at –20 °C until antibody determination. Feces and mouth wash samples were taken as follows. For feces, 100 mg was collected and resuspended in 500 µL of ice-cold PBS (supplemented with 5% fat-free dry milk and 1 mM of PMSF). Following homogenization using a plastic device, the samples were centrifuged at 7000 rpm and 4 °C for 15 min. Supernatants were transferred to a new tube and kept at 4 °C for immediate analysis by ELISA. Mouth-wash samples were obtained from mice anesthetized with isoflurane, which were subjected to mouth wash with 120 µL of PBS. The obtained washes had 1 mM PMSF added. Feces extracts and mouth-wash samples were immediately plated for antibody determination by ELISA.

ELISA was run to measure S protein binding antibodies following previously reported protocols [27]. Polystyrene plates (96 wells) were coated overnight at 4 °C with spike protein (100 ng/well, Sinobiological cat. no. 40589-V08H4) in carbonate buffer (15 mM Na₂CO₃, 35 mM NaHCO₃, pH 9.6). Before all following steps, plates were washed three times with PBS + Tween 0.05% (PBS-T). Plates were blocked with 5% fat-free dry milk in PBS for 2 h at room temperature. Serial dilutions of sera (1:40–1:160) or mouth wash and fecal extracts (1:1 and 1:2) in PBS were added and incubated at 4 °C overnight. Afterward, for all samples, secondary antibodies labeled with goat horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG for sera samples or anti-mouse IgA for feces and mouth-wash samples were diluted in PBS (dilution 1:2000) and plated. Finally, an ABTS substrate solution [0.6 mM 2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) + 0.1 M citric acid + 1 mM H₂O₂, pH 4.35] was added and OD values at 405 nm were measured after 30 min using a MultiskanR FC equipment (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). IgG antibody titers were determined as the reciprocal of the highest dilution of sera with a mean OD value above the OD value from the group treated with the vehicle alone (negative control) plus 2 × SD. Statistical differences were determined using one-way ANOVA employing the GraphPad Prism version 5.01 software ($p < 0.05$).

3. Results

The chimeric protein LTB-RBD is based on the LTB carrier and a segment of RBD (aa 439–504 from the S protein). The sequence was chosen because the RBD is considered a crucial antigen targeting T and B cell epitopes. In this study, two constructions were explored based on the RBD of the Wuhan sequence and VOC delta. The main difference between the delta variant and Wuhan sequences is two amino acid changes, arginine (R) instead of leucine (L) and lysine (K) instead of threonine (T). The sequences were modeled using the Phyre2 engine to determine the secondary structure. The in silico analysis did not predict radical changes in the secondary structure between the Wuhan sequence and delta variant due to these amino acid changes (Figures 1 and 2). The expression of LTB-RBD in a Rosetta-pET21b (+)-flask system was assessed using 0.1 mM IPTG at two induction times (4 and 7 h). Analysis of the SDS-PAGE results revealed the presence of a 21 kDa protein in the cultures of both variants induced that was absent in both the preinduction cultures and WT cultures, matching with the theoretical molecular weight for the mature form of LTB-RBD Wuhan sequence (20.5 kDa) since the protein MW comprising the signal peptide is 22.9 kDa (Figure 3). The recombinant LTB-RBD was detected in both the soluble and insoluble fractions with similar abundance in such fractions. As for the LTB-RBD delta construct, similar findings were obtained in terms of expression in inclusion bodies and recombinant protein yields in crude extracts (data not shown). However, in this case, no soluble recombinant protein was observed.

Since lactose is a more convenient inducer (lower cost and toxicity) than IPTG, the production of LTB-RBD was assessed using 15 g/L lactose as inducer [28]. SDS-PAGE analysis revealed that the target protein was expressed roughly at similar levels with no major variation in solubility (Figure 3). To further confirm the antigenicity of the *E. coli*-produced LTB-RBD, a Western blot was performed using either an anti-His antibody or an anti-CTB hyperimmune serum. All these analyses revealed an immunoreactive protein of the same molecular weight that matched the differential protein detected in the SDS-PAGE analysis, confirming the identity and antigenic activity of both LTB and RBD sequences (Figures 4 and 5).

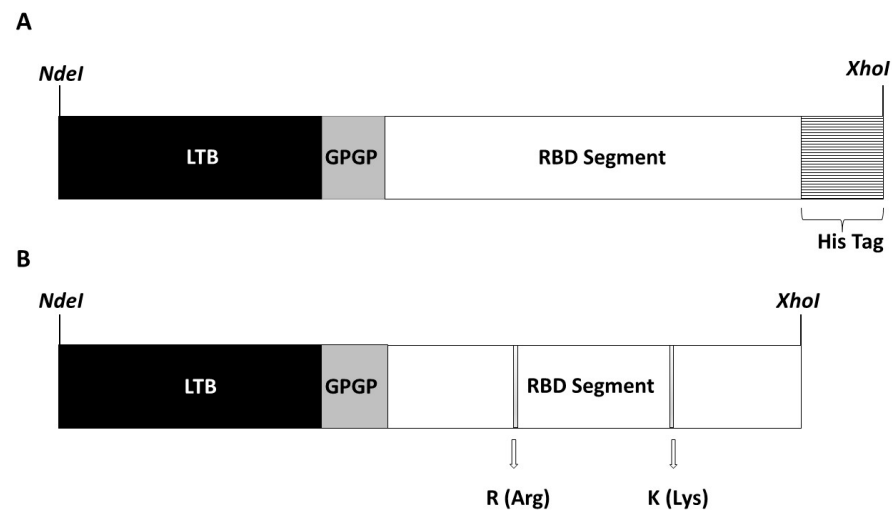


Figure 1. Schematic representation of the chimeric proteins produced and evaluated in this study. **(A)** Map of the chimeric protein LTB-RBD targeting the Wuhan isolate. **(B)** Map of the chimeric protein LTB-RBD targeting the delta variant. The fusion proteins comprise the full-length sequence of LTB (in black), a GPGP linker (in gray), a segment of the RBD from SARS-CoV-2 (aa 439–504, carrying B and T cell epitopes, in white), and hexa-histidine tag (in horizontal stripes). The delta variant construct has two amino acid changes (arrows): arginine (R) instead of leucine (L) and lysine (K) instead threonine (T). *NdeI* and *XhoI* restriction sites were placed at the 5' and 3' ends, respectively, to facilitate subcloning into the pET 21b (+) vector.

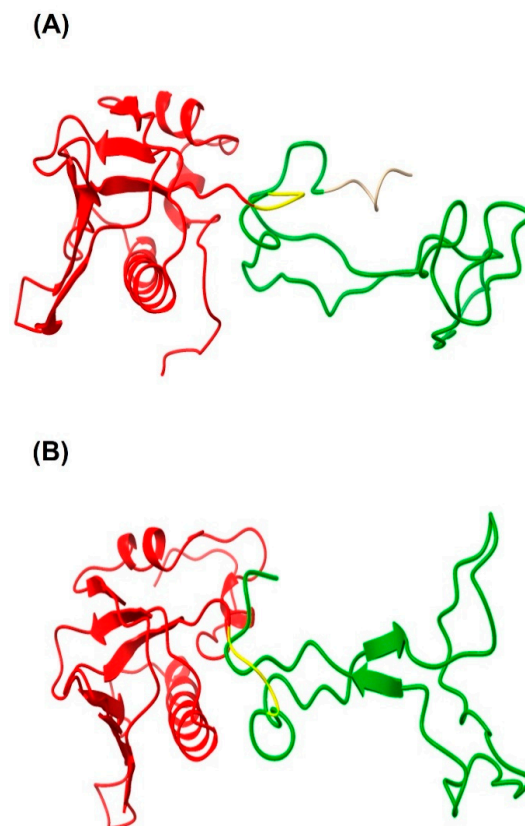


Figure 2. A 3D structure model of the candidate vaccine LTB-RBD targeting the Wuhan sequence **(A)** or delta variant **(B)**. The full-length sequence of LTB (red) fused to an RBD segment (aa 439–504, green). GPGP linker (yellow) placed between the LTB and RBD domains. The His tag is only present in LTB-RBD Wuhan. These structures were modeled with the Phyre2 server.

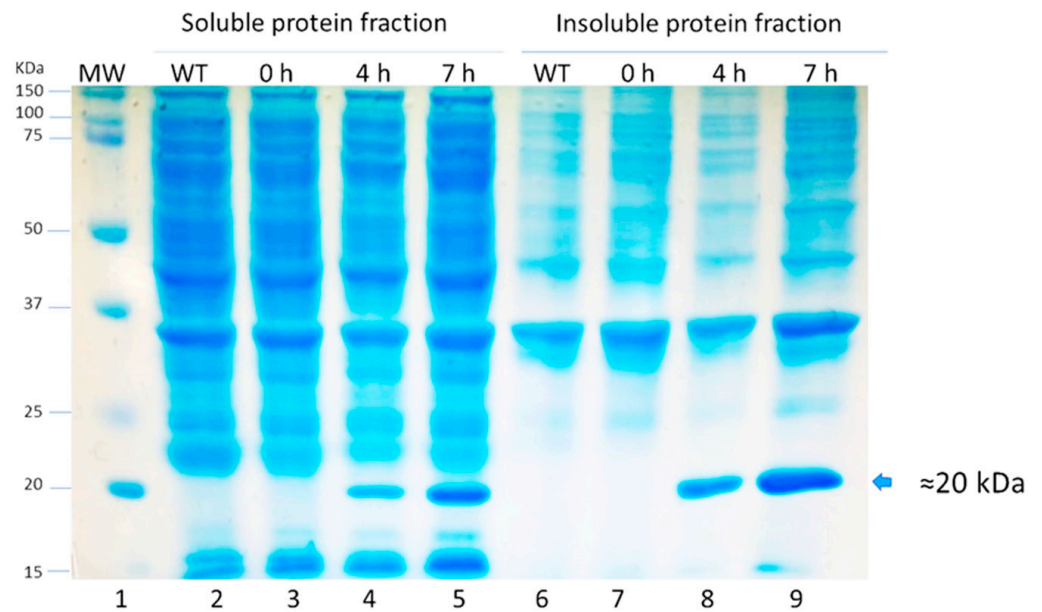


Figure 3. SDS-PAGE analysis of protein extracts from cultures expressing LTB-RBD Wuhan induced for 4 and 7 h at 28 °C with lactose (lanes 2 to 5: soluble protein fraction and lanes 6 to 9: insoluble protein fraction). Lane 1: molecular weight marker, lanes 2 and 6: untransformed cultures, lanes 3 and 7: uninduced cultures, lanes 4 and 8: cultures induced for 4 h, and lanes 5 and 9: cultures induced for 7 h.

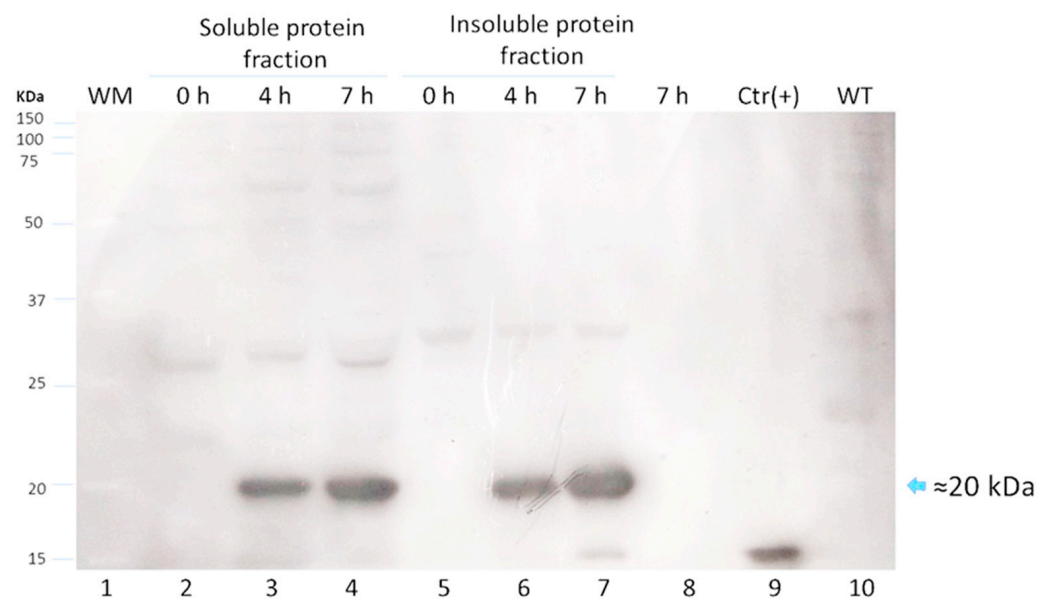


Figure 4. Western blot analysis for LTB-RBD Wuhan using anti-cholera toxin B subunit (CTB) serum to analyze protein extracts from cultures induced for 4 or 7 h at 28 °C with lactose as inducer (lanes 2 to 4: soluble protein fraction and lanes 5 to 7: insoluble protein fraction). Lane 1: molecular weight marker, lanes 2 and 5: uninduced cultures, lanes 3 to 6: cultures induced for 4 h, lanes 4 and 7: cultures induced for 7 h, lane 8: culture medium supernatant, lane 9: cholera toxin subunit (CTB) used as positive control, and lane 10: soluble fraction of an untransformed culture.

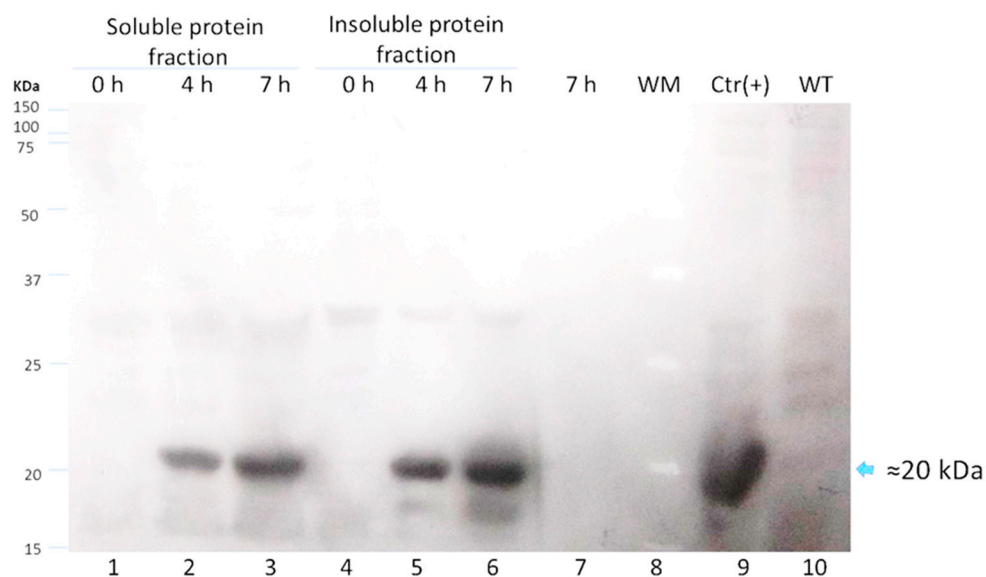


Figure 5. Western blot analysis for LTB-RBD Wuhan using anti-His tag of protein extracts from cultures induced for 4 or 7 h at 28 °C with lactose as inducer (lanes 1 to 3: soluble protein fraction and lanes 4 to 6: insoluble protein fraction). Lanes 1 and 4: uninduced cultures, lanes 2 and 5: cultures induced for 4 h, lanes 3 and 6: cultures induced for 7 h, lane 7: culture medium supernatant, lane 8: molecular weight marker, lane 9: RBD protein as positive control, and lane 10: soluble fraction of an untransformed culture.

The production of LTB-RBD was further scaled up to a 1 L bioreactor using lactose as inducer. The analysis of biomass fractions withdrawn over a period of 9 h in the postinduction phase revealed that the recombinant protein accumulation peaked at 6 h postinduction and remained at a similar level at the end time point (9 h postinduction, Figure 6). In terms of solubility, a shift was observed with respect to flask fermentations, with an increase in the abundance of the protein in the insoluble fraction. The biomass showed a constant increase with a maximum density of 7.5 g/L ($OD_{600nm} = 3.0$) reached at the endpoint (Figure 6). The purification method based on IMAC allowed obtaining pure LTB-RBD Wuhan with average yields of 1.2 mg per liter of culture (Figure 7). As for the LTB-RBD delta construct, the purification method based on IMAC followed by anionic exchange chromatography allowed reaching yields of 3.5 mg of pure LTB-RBD per liter of culture (1.4 mg of protein per g of fresh biomass, Figure 8). In Figure 9, a summary of the implemented protocols for the two versions of the LTB-RBD produced in this report is presented.

The immunogenicity of LTB-RBD was assessed in test mice subjected to two vaccine doses administered by distinct routes. The assessment of anti-spike IgG levels revealed that significant IgG responses were induced in the s.c. immunized group, with a higher response in the high-dose group (average titers of 1600 for the 10 μ g LTB-RBD + Al(OH)₃ group and 800 for the 5 μ g LTB-RBD + Al(OH)₃ group). Interestingly, the group orally immunized with 10 μ g LTB-RBD + CT had a titer value of 1600, whereas the formulation lacking the CT adjuvant showed very low antibody titer. In contrast, nasal immunization failed to induce relevant IgG responses, regardless of the use of CT as adjuvant (Figure 10A).

Regarding the mucosal immune response, IgA measurements in saliva (mouth washes) revealed that significant levels were triggered in the groups immunized by the nasal route, regardless of the use of CT as adjuvant and in the s.c. immunized group receiving the high antigen dose (Figure 10B). Intestinal IgA responses were evaluated by measuring IgA levels in feces, showing that only the nasally immunized groups triggered a significant response, regardless of the use of CT as adjuvant (Figure 10C).

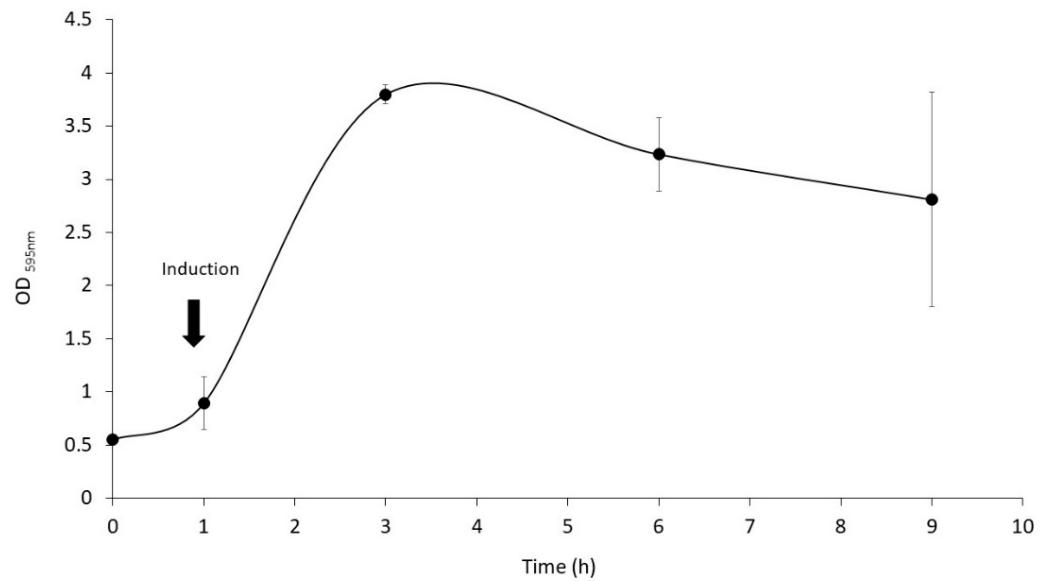


Figure 6. Kinetics for the fermentation in a 1.5 L bioreactor. The LTB-RBD Wuhan antigen was produced in batch cultures grown in a 1.5 L jar fermenter (ez-Control system model 56,156, Applikon Biotechnology) containing 1 L of LB medium plus antibiotics. pH was maintained at 7.0 ± 0.5 , O_2 saturation was kept above 40% by culture stirring (400–600 rpm) and aeration (0.5–1.5 L/min). The temperature was held at 37 °C.

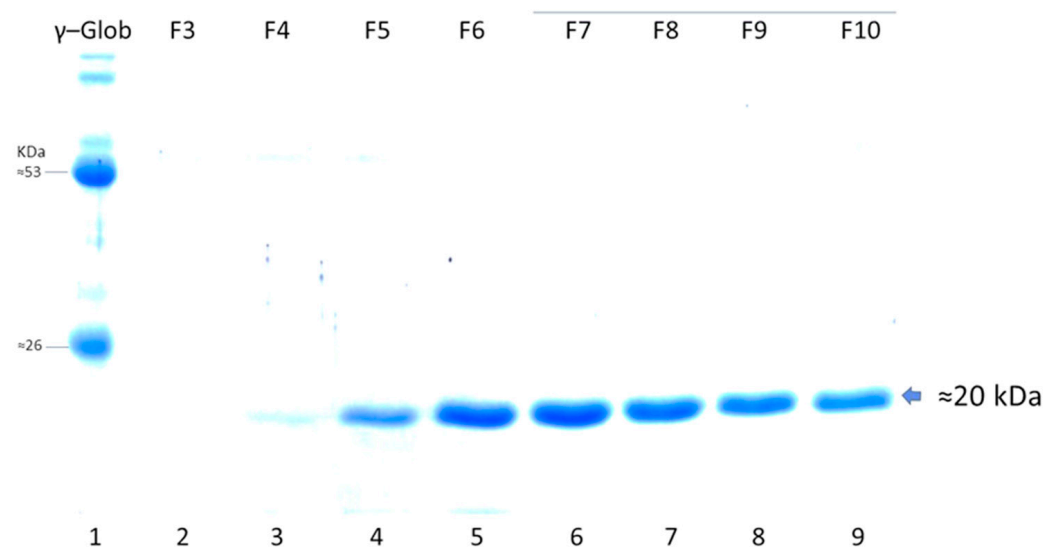


Figure 7. SDS-PAGE analysis of elution fractions during IMAC purification of LTB-RBD Wuhan. Lane 1: γ globulin from human blood as molecular weight marker, lanes 2 to 9: eluted fractions upon entrance of imidazole for protein desorption.

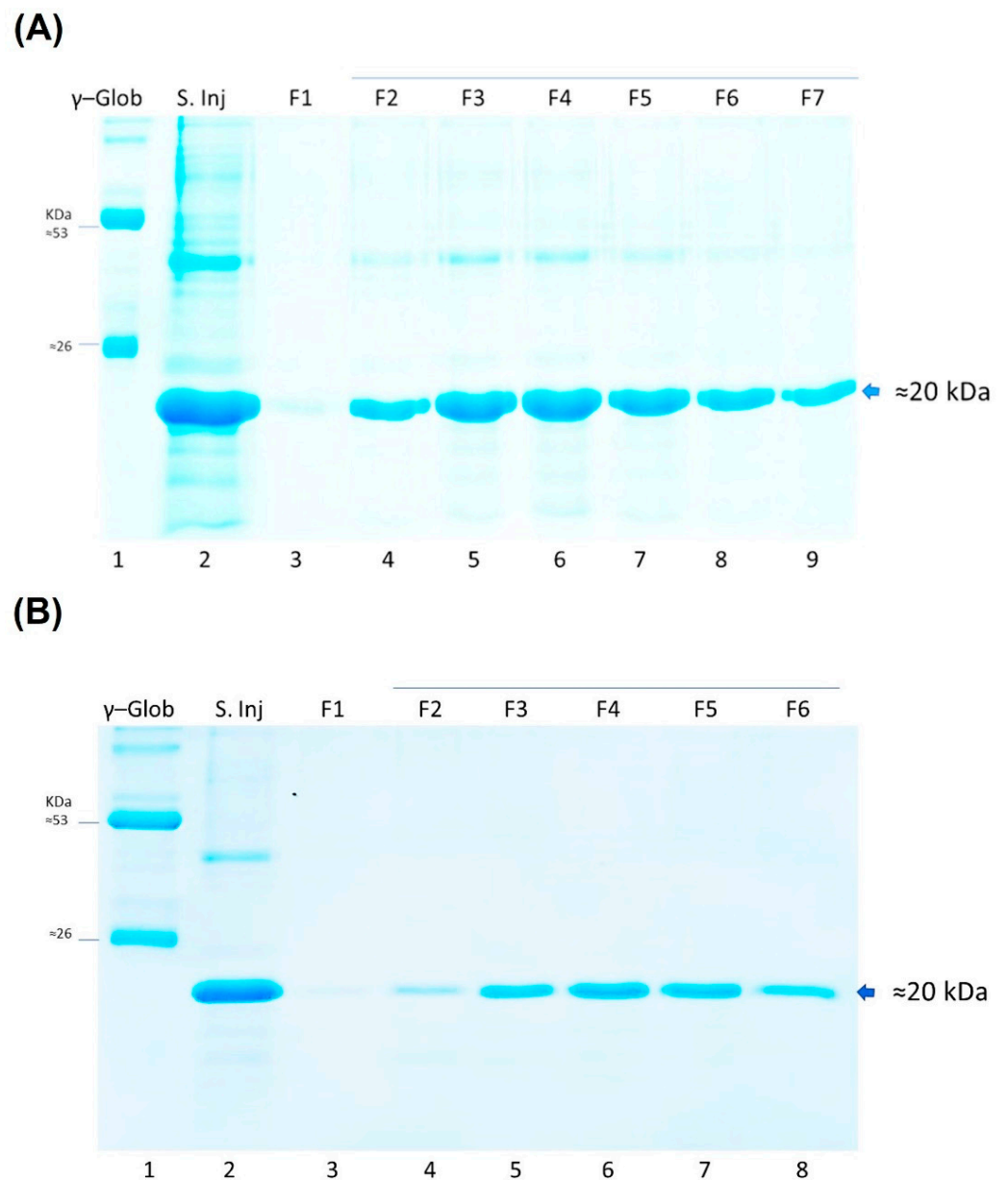


Figure 8. (A) SDS-PAGE analysis of eluted fractions during IMAC purification of LTB-RBD delta variant. Lane 1: γ globulin from human blood as molecular weight marker, lane 2: sample injected into IMAC column, and lanes 3 to 9: eluted fractions upon entrance of imidazole for protein desorption. (B) SDS-PAGE analysis of elution fractions during anionic exchange chromatography. Lane 1: γ globulin from human blood as molecular weight marker, lane 2: sample injected into anionic column, and lanes 3 to 8: eluted fractions upon entrance of NaCl for protein desorption.

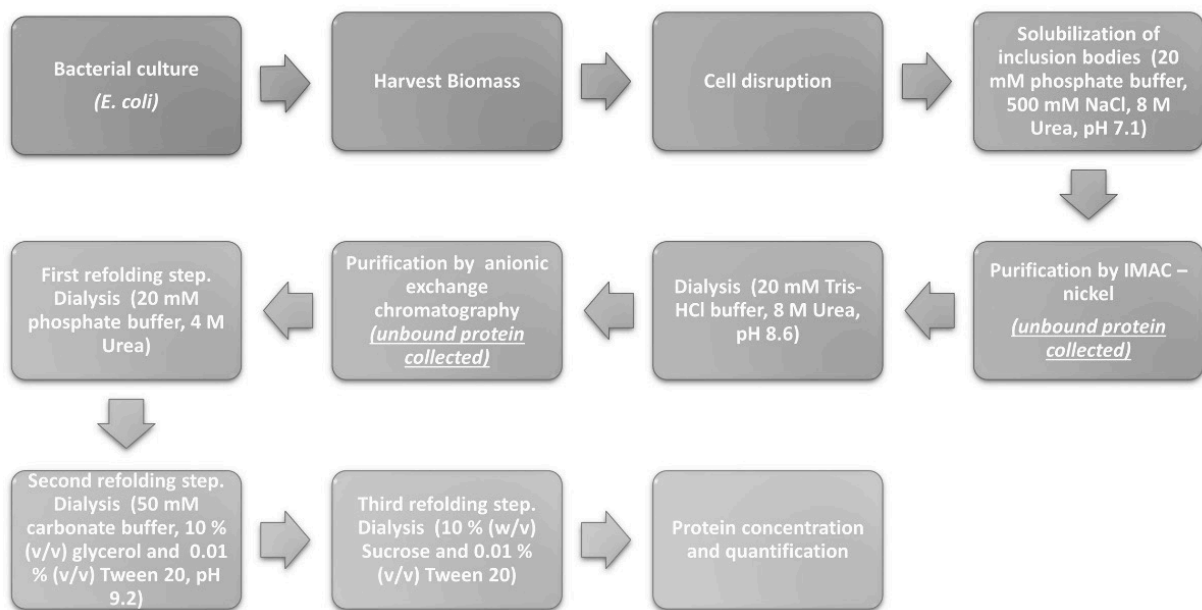
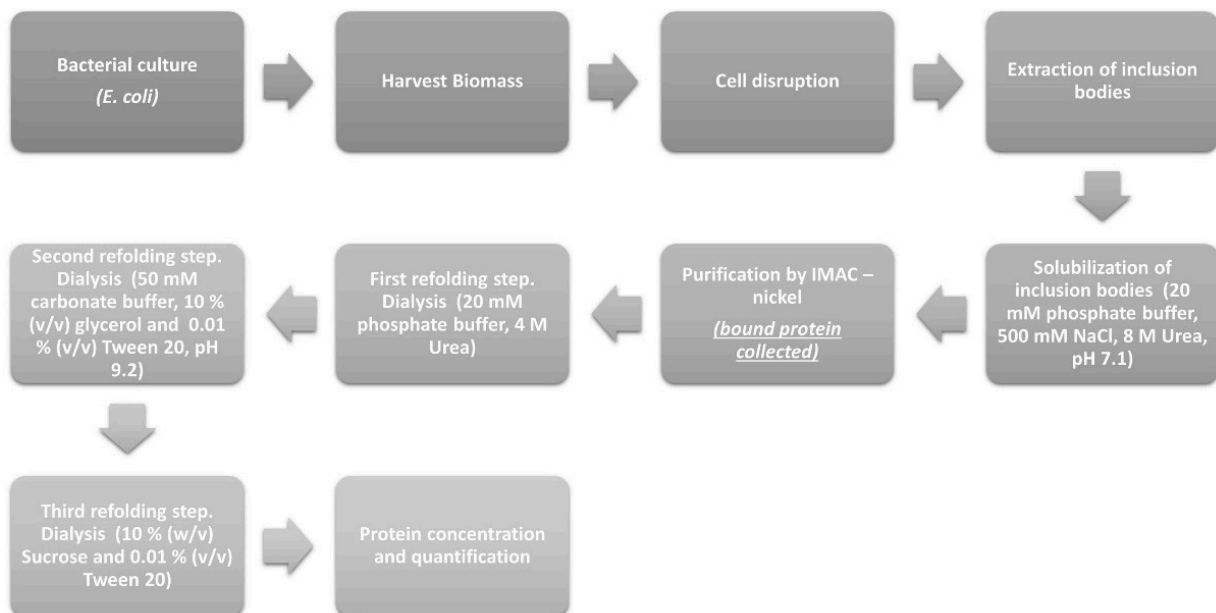
(A)**(B)**

Figure 9. Description of the steps followed in the methodology implemented for the purification of LTB-RBD antigens. **(A)** Protein purification workflow for LTB-RBD Wuhan, which has a His tag. **(B)** Protein purification workflow for LTB-RBD delta, which lacks tags.

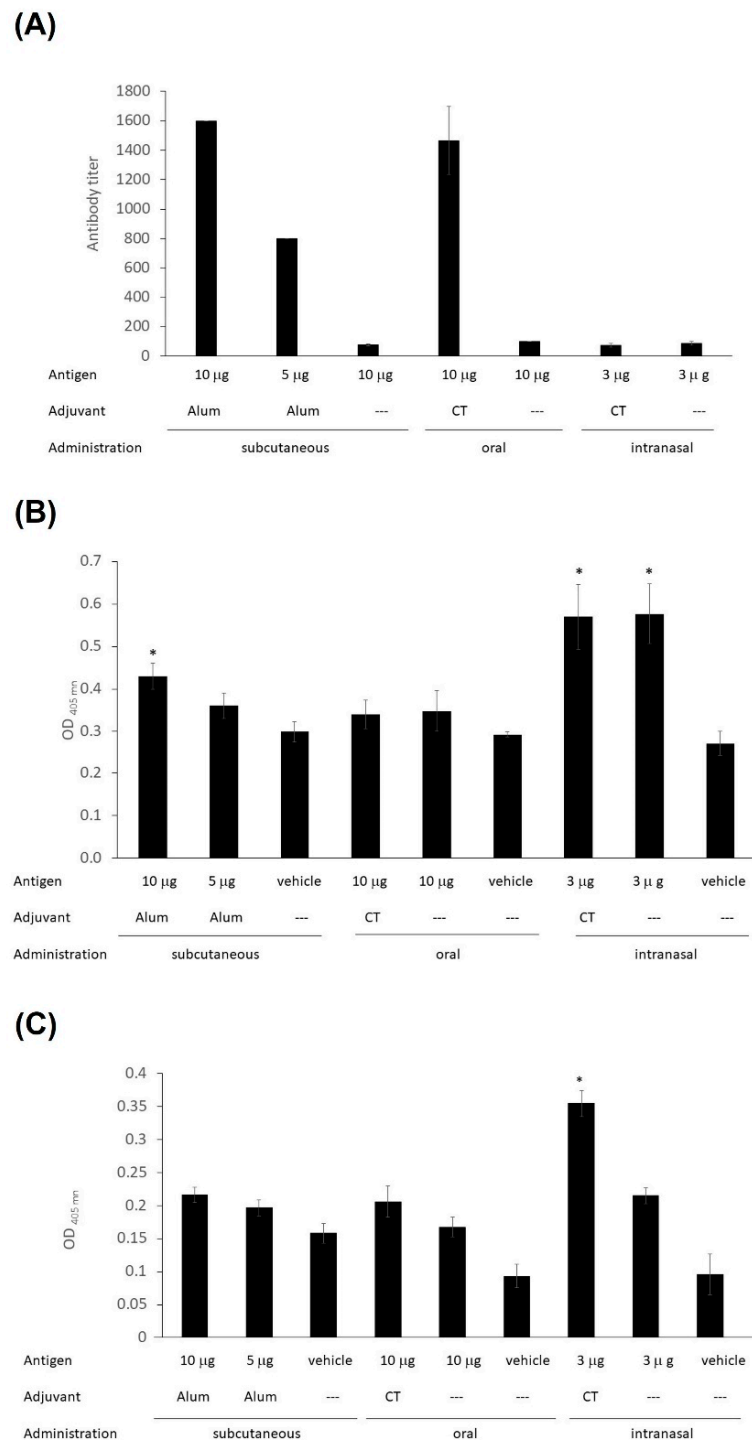


Figure 10. Humoral response induced by LTB-RBD in test mice. (A) IgG titers measured in serum. (B) IgA levels measured in mouth washes. (C) IgA levels measured in feces. Antibodies were measured by ELISA using the S protein as the target antigen. Samples were collected on day 27. The error bars are the standard deviation of the mean absorbance value. Asterisks denote significant differences ($p < 0.05$) versus the control group (vehicle).

4. Discussion

In the present study, LTB-RBD (a chimeric protein comprising a mucosal adjuvant carrier (LTB) and a segment from the RBD of SARS-CoV-2) was produced and purified as an antigen vaccine candidate for the formulation of mucosal vaccines against COVID-19.

The LTB-RBD candidate was expressed as inclusion bodies, which is in line with the report by Jegouic et al., who assessed the expression of fragments of the S protein from SARS-CoV-2, including segments covering the RBD sequence; however, they remained in inclusion bodies despite performing the expression at a lower temperature (15 °C) and with different IPTG concentrations [29]. Moreover, recombinant LTB has been previously reported to be mainly produced as inclusion bodies in *E. coli* [30,31]. The LTB-RBD antigen accumulated as inclusion bodies was subjected to purification and refolding procedures. The presence of urea in the solubilization procedure allowed purifying the candidate using IMAC with Ni²⁺ ions. In-column refolding was tried, but the results were poor since the protein precipitated inside the column upon urea removal. Once the candidate was desorbed from the Ni²⁺ ions using imidazole, the eluted fractions containing highly pure protein were subjected to refolding using dialysis. Several buffers were tested to accomplish refolding: the sequence of buffers that successfully produced refolded protein was PBS + 4 M urea at pH 7.1, 50 mM carbonate + 10% (v/v) glycerol 0.01% (v/v) + Tween 20 at pH 9.2, and 10% (w/v) sucrose + 0.01% (v/v) Tween 20 (Table 1). The use of PBS as final buffer for the candidate was forbidden, as it completely precipitated the candidate upon freezing.

Table 1. Protein concentration after a third step of refolding buffer.

Second Refolding Step				
Formulation	50 mM Na ₂ CO ₃ , 10% (v/v) Glycerol, 0.01% (v/v) Tween 20, pH 9.2			
Protein concentration (µg/mL)	18.23			
Protein recovery	100%			
Third Refolding Step				
Formulation	PBS 1×, 0.01% (v/v) Tween 20	PBS 1×	10 mM Phosphate, 9% (w/v) sucrose, 0.01% (v/v) Tween 20, pH 7.0	10% (w/v) Sucrose, 0.01% (v/v) Tween 20
Protein concentration (µg/mL)	4.57	0	2.09	15.30
Protein recovery (%)	25	0	11	87

Studies performed with SARS-CoV sequences revealed that the RBD produced in *E. coli* is antigenic and immunogenic, although at a lower magnitude than that expressed in mammalian cells, while no yields were reported for the *E. coli* system [32]. RBD has also been expressed fused to a solubility-enhancing peptide (SEP) tag containing nine arginine residues, resulting in an enhancement in the accumulation of soluble RBD. This RBD version was produced at yields of up to 2 mg/L and recognized the ACE2 receptor and induced antibodies able to interact with a mammalian made S1 protein [33]. Another case is the report by McGuire et al. [34], in which fusion proteins were designed based on the thermophilic family of nine carbohydrate-binding modules (CBM9) as an N-terminal carrier protein and affinity tag and different S protein segments. Among the proteins tested, the one called CBM9-ID-H1 carrying amino acids 540–588 from the S protein was produced at yields up to 122 mg/L of pure protein, which was widely reactive with COVID-19 convalescent sera, suggesting that it retains the antigenic determinants; therefore, it is proposed as a promising immunogen. These studies support the use of *E. coli* to produce functional SARS-CoV-2 antigens, a system that offers lower cost compared to mammalian cell-based platforms.

The functional activity of LTB-RBD was initially assessed in mice subjected to two immunizations by different routes (subcutaneous, oral, and nasal). Since sera from mice s.c. receiving the LTB-RBD antigen (10 µg) plus alum as adjuvant showed significant serum anti-S IgG responses (and modest anti-S IgA responses in the mouth), we believed that this antigen has a promising potential to induce SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. Since LTB-RBD was able to induce both systemic IgG responses and modest IgA responses in

mucosal compartments when s.c. administered but induced poor seric IgG levels and high IgA responses when i.n. administered, we propose that combining the administration routes in the immunization scheme (i.e., a third boosting i.n. dose in the s.c. immunized group) might lead to optimal immune response comprising robust humoral responses in both the systemic and mucosal levels. These findings justify expanding the characterization of LTB-RBD to assess the cellular response and perform neutralization assays to determine the immunoprotective potential of these vaccine candidates. Currently, seven intranasal anti-SARS-CoV-2 vaccines have reached clinical evaluation. Most of these developments are based on viral vectors or live attenuated viruses [35]. The oral delivery of SARS-CoV-2 vaccines has also been explored. For instance, Jawalagatti et al. [36] reported a Salmonella strain delivering a replicon coding for SARS-CoV-2 RBD, HR, M, and epitopes of nsp13 (RNA helicase), which successfully induced protective immunity in mouse and hamster models of SARS-CoV-2 infection associated to cellular and humoral responses, including the efficient induction of IgA responses in the respiratory mucosa.

Immunogenic carriers are essential when the target antigen has low complexity and is therefore not very immunogenic. LTB is a promising carrier as it has immunomodulatory effects and facilitates the translocation of the fused antigen into the submucosa, in addition to increasing the complexity of the antigen. LTB has been used experimentally in numerous studies as carrier of unrelated antigens, with the ability to favor the induction of humoral responses and memory B lymphocytes. LTB enhances the humoral response against unrelated, genetically fused antigens when administered by either i.n. or oral routes [37,38]. In contrast to the LT holotoxin, LTB is not an inherently toxic protein and has been used as adjuvant in a vaccine candidate against ETEC diarrhea that reached clinical trials with positive results [39]. Moreover, LTB has also proven adjuvant activity when parenterally administered [40]; therefore, the design of combined parenteral–mucosal immunization scheme could be achieved with the LTB-RBD antigen to induce proper immune responses in terms of potency and compartmentalization (i.e., parenteral priming and mucosal boosting), offering the potential to prevent virus spread at early stages of infection. Interestingly, sublingual immunization has also been proposed as a convenient route able to induce high immune responses and deserves further exploration for the LTB-RBD antigen [41]. LTB has been used as antigen/adjuvant in an oral vaccine against enterotoxigenic *E. coli*; it induced antibodies and memory B lymphocytes with no serious adverse effects [42]. Based on this background, LTB was chosen as the carrier agent that will hypothetically increase the induction of immune responses toward SARS-CoV-2 epitopes after administration of the antigen by the nasal or oral route. In this respect, the development of mucosal vaccines not only represents an attractive advantage in terms of friendlier administration (more acceptable by patients) but also the opportunity to achieve the induction of more attractive immunological profiles, considering that immunization by these routes leads to more efficient induction of immune responses in the airway mucosa, which is critical to control or prevent the SARS-CoV-2 infection.

The emergence of the delta variant, which became of high epidemiological relevance given its marked pathogenicity and transmissibility and is likely to evade the immunity induced by the Wuhan strain [43], prompted us to design a new version of the LTB-RBD carrying the delta-specific sequence. The expression of this new antigen led to its recovery as an insoluble protein with similar yields to those observed for LTB-RBD Wuhan. Given the regulatory issues associated with using the His tag, this new construct lacks tags, and the purification strategy was then established to account for a tag-free procedure. Anionic exchange chromatography allowed purifying the LTB-RBD-delta antigen to homogeneity. The previously standardized conditions for refolding of the LTB-RBD Wuhan allowed us to successfully refold the LTB-RBD delta antigen with similar yields with respect to the former, suggesting that the methods developed are robust and could be easily applied to newer variants. We are currently assessing this approach to produce an LTB-RBD omicron antigen.

5. Conclusions

The distinct versions of the LTB-RBD antigen obtained in this study constitute promising candidates for developing vaccines for which detailed expression and purification protocols have been developed. The LTB-RBD production platform used offers low cost, absence of tags, and easy adaptation to new variants, while supporting the development of mucosal vaccines. The obtained LTB-RBD antigens generate the perspective to achieve mucosal anti-COVID-19 vaccines, which promise to induce sterilizing immunity against SARS-CoV-2.

Author Contributions: Conceptualization, S.R.-M. and O.G.-O.; methodology, D.O.G.-A., K.I.S.-A. and O.G.-O.; formal analysis, S.R.-M., M.C.-G. and O.G.-O.; writing—original draft preparation, S.R.-M., K.I.S.-A. and O.G.-O.; writing—review and editing, S.R.-M., M.C.-G., D.O.G.-A., K.I.S.-A. and O.G.-O.; supervision, S.R.-M. and O.G.-O.; project administration, S.R.-M.; funding acquisition, S.R.-M., M.C.-G. and O.G.-O. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, grant numbers 311879, C-146/2021, and 321364.

Institutional Review Board Statement: The mouse experiments conducted in this study were approved and followed up by the Research and Teaching Committee of the Chemical Faculty at the University of San Luis Potosí, Mexico (registration CEID-2020-07R1).

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Acknowledgments: We thank Lourdes Betancourt-Mendiola and Andrea Romero-Maldonado for administrative and technical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Yip, M.S.; Cheung, C.Y.; Li, P.H.; Bruzzone, R.; Peiris, J.S.M.; Jaume, M. Investigation of Antibody-Dependent Enhancement (ADE) of SARS coronavirus infection and its role in pathogenesis of SARS. *BMC Proc.* **2011**, *5* (Suppl. S1), 80. [[CrossRef](#)]
2. Jaume, M.; Yip, M.S.; Kam, Y.W.; Cheung, C.Y.; Kien, F.; Roberts, A.; Li, P.H.; Dutry, I.; Escriou, N.; Daeron, M.; et al. SARS-CoV subunit vaccine: Antibody-mediated neutralisation and enhancement. *Hong Kong Med. J.* **2012**, *18* (Suppl. S2), 31–36.
3. Luo, F.; Liao, F.L.; Wang, H.; Tang, H.B.; Yang, Z.Q.; Hou, W. Evaluation of Antibody-Dependent Enhancement of SARS-CoV Infection in Rhesus Macaques Immunized with an Inactivated SARS-CoV Vaccine. *Virol. Sin.* **2018**, *33*, 201–204. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Thanh, L.T.; Andreadakis, Z.; Kumar, A.; Román, R.G.; Tollefsen, S.; Saville, M.; Mayhew, S. The COVID-19 vaccine development landscape. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2020**, *19*, 305–306. [[CrossRef](#)]
5. Du, L.; He, Y.; Zhou, Y.; Liu, S.; Zheng, B.J.; Jiang, S. The spike protein of SARS-CoV-a target for vaccine and therapeutic development. *Nat. Rev. Microbiol.* **2009**, *7*, 226–236. [[CrossRef](#)]
6. Swadling, L.; Capone, S.; Antrobus, R.D.; Brown, A.; Richardson, R.; Newell, E.W.; Halliday, J.; Kelly, C.; Bowen, D.; Fergusson, J.; et al. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 261ra153. [[CrossRef](#)]
7. Polack, F.P.; Thomas, S.J.; Kitchin, N.; Absalon, J.; Gurtman, A.; Lockhart, S.; Perez, J.L.; Marc, G.P.; Moreira, E.D.; Zerbini, C.; et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA COVID-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, 2603–2615. [[CrossRef](#)]
8. Falsey, A.R.; Sobieszczyk, M.E.; Hirsch, I.; Sproule, S.; Robb, M.L.; Corey, L.; Neuzil, K.M.; Hahn, W.; Hunt, J.; Mulligan, M.J.; et al. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) COVID-19 Vaccine. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 2348–2360. [[CrossRef](#)]
9. Izcovich, A.; Ragusa, M.A.; Tortosa, F.; Marzi, M.A.L.; Agnoletti, C.; Bengolea, A.; Ceirano, A.; Espinosa, F.; Saavedra, E.; Sanguine, V.; et al. Prognostic factors for severity and mortality in patients infected with COVID-19: A systematic review. *PLoS ONE* **2020**, *15*, e0241955. [[CrossRef](#)]
10. Tanriover, M.D.; Doğanay, H.L.; Akova, M.; Güner, H.R.; Azap, A.; Akhan, S.; Köse, Ş.; Erdinç, F.Ş.; Akalın, E.H.; Tabak, Ö.F.; et al. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): Interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *Lancet* **2021**, *398*, 213–222. [[CrossRef](#)]
11. Creech, C.B.; Walker, S.C.; Samuels, R.J. SARS-CoV-2 Vaccines. *JAMA* **2021**, *325*, 1318–1320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Abu-Raddad, L.J.; Chemaitelly, H.; Butt, A.A.; National Study Group for COVID-19 Vaccination. Effectiveness of the BNT162b2 COVID-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants. *N. Engl. J. Med.* **2021**, *385*, 187–189. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Mast, T.C.; Kierstead, L.; Gupta, S.B.; Nikas, A.A.; Kallas, E.G.; Novitsky, V.; Mbewe, B.; Pitisuttithum, P.; Schechter, M.; Vardas, E.; et al. International epidemiology of human pre-existing adenovirus (Ad) type-5, type-6, type-26 and type-36 neutralizing antibodies: Correlates of high Ad5 titers and implications for potential HIV vaccine trials. *Vaccine* **2010**, *28*, 950–957. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. EMA Recommends Nuvaxovid for Authorisation in the EU. Available online: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-recommends-nuvaxovid-authorisation-eu> (accessed on 24 September 2022).
15. Studier, F.M. T7 Expression Systems for Inducible Production of Proteins from Cloned Genes in *E. coli*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2018**, *124*, e63. [[CrossRef](#)]
16. Hansson, M.; Nygren, P.A.; Ståhl, S. Design and production of recombinant subunit vaccines. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2000**, *32*, 95–107. [[CrossRef](#)]
17. Makrides, S.C. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* **1996**, *60*, 512–538. [[CrossRef](#)]
18. Billman-Jacobe, H. Expression in bacteria other than *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Biotechnol.* **1996**, *7*, 500–504. [[CrossRef](#)]
19. Tacket, C.O.; Mason, H.S.; Losonsky, G.; Clements, J.D.; Levine, M.M.; Arntzen, C.J. Immunogenicity in humans of a recombinant bacterial antigen delivered in a transgenic potato. *Nat. Med.* **1998**, *4*, 607–609. [[CrossRef](#)]
20. Liljeqvist, S.; Ståhl, S. Production of recombinant subunit vaccines: Protein immunogens, live delivery systems and nucleic acid vaccines. *J. Biotechnol.* **1999**, *73*, 1–33. [[CrossRef](#)]
21. Butt, T.R.; Edavettal, S.C.; Hall, J.P.; Mattern, M.R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* **2005**, *43*, 1–9. [[CrossRef](#)]
22. Leser, E.W.; Asenjo, J.A. Rational design of purification processes for recombinant proteins. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.* **1992**, *584*, 43–57. [[CrossRef](#)]
23. Lehmann, M.; Wyss, M. Engineering proteins for thermostability: The use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2001**, *12*, 371–375. [[CrossRef](#)]
24. Basu, A.; Li, X.; Leong, S.S.J. Refolding of proteins from inclusion bodies: Rational design and recipes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *92*, 241–251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. New, R.R.C. Formulation technologies for oral vaccines. *Clin. Exp. Immunol.* **2019**, *198*, 153–169. [[CrossRef](#)]
26. Kelley, L.A.; Mezulis, S.; Yates, C.M.; Wass, M.N.; Sternberg, M.J. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protoc.* **2015**, *10*, 845–858. [[CrossRef](#)]
27. Farfán-Castro, S.; García-Soto, M.J.; Comas-García, M.; Arévalo-Villalobos, J.I.; Palestino, G.; González-Ortega, O.; Rosales-Mendoza, S. Synthesis and immunogenicity assessment of a gold nanoparticle conjugate for the delivery of a peptide from SARS-CoV-2. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2021**, *34*, 102372. [[CrossRef](#)]
28. Tan, J.S.; Ramanan, R.N.; Ling, T.C.; Mustafa, S.; Ariff, A.B. The role of lac operon and lac repressor in the induction using lactose for the expression of periplasmic human interferon- α 2b by *Escherichia coli*. *Ann. Microbiol.* **2012**, *62*, 1427–1435. [[CrossRef](#)]
29. Jegouic, S.M.; Loureiro, S.; Thom, M.; Paliwal, D.; Jones, I.M. Recombinant SARS-CoV-2 spike proteins for sero-surveillance and epitope mapping. *bioRxiv* **2020**. [[CrossRef](#)]
30. Salimian, J.; Salmanian, A.H.; Khalesi, R.; Mohseni, M.; Moazzeni, S.M. Antibody against recombinant heat labile enterotoxin B subunit (rLTB) could block LT binding to ganglioside M1 receptor. *Iran J. Microbiol.* **2012**, *2*, 120–127.
31. Fischer, G.; Conceição, S.M.; Leite, F.P.; Moraes, C.M.; Ferreira, L.N.; Vilela, C.O.; Caetano, C.F.; Vargas, G.D.; Hübner, S.O.; Vidor, T.; et al. Recombinant *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit humoral adjuvant effect depends on dose and administration route. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 489–495. [[CrossRef](#)]
32. Du, L.; Zhao, G.; Chan, C.C.S.; Sun, S.; Chen, M.; Liu, Z.; Guo, H.; He, Y.; Zhou, Y.; Zheng, B.J.; et al. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and *E. coli* cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity. *Virology* **2009**, *393*, 144–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Brindha, S.; Kuroda, Y. A Multi-Disulfide Receptor-Binding Domain (RBD) of the SARS-CoV-2 Spike Protein Expressed in *E. coli* Using a SEP-Tag Produces Antisera Interacting with the Mammalian Cell Expressed Spike (S1) Protein. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 1703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. McGuire, B.E.; Mela, J.E.; Thompson, V.C.; Cucksey, L.R.; Stevens, S.E.; McWhinnie, R.L.; Winkler, D.F.H.; Pelech, S.; Nano, F.E. *Escherichia coli* recombinant expression of SARS-CoV-2 protein fragments. *Microb. Cell Fact.* **2022**, *21*, 21. [[CrossRef](#)]
35. World Health Organization (n.d.). COVID-19 Vaccine Tracker and Landscape. World Health Organization. Retrieved 23 February 2022. Available online: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (accessed on 23 August 2022).
36. Jawalagatti, V.; Kirthika, P.; Hewawaduge, C.; Yang, M.S.; Park, J.Y.; Oh, B.; Lee, J.H. Bacteria-enabled oral delivery of a replicon-based mRNA vaccine candidate protects against ancestral and delta variant SARS-CoV-2. *Mol. Ther.* **2022**, *30*, 1926–1940. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Harutyunyan, S.; Neuhauser, I.; Mayer, A.; Aichinger, M.; Szijártó, V.; Nagy, G.; Nagy, E.; Girardi, P.; Malinoski, F.J.; Henics, T. Characterization of ShigE_{TEC}, a Novel Live Attenuated Combined Vaccine against Shigellae and ETEC. *Vaccines* **2020**, *8*, 689. [[CrossRef](#)]

38. Peng, X.; Zhang, R.; Wang, C.; Yu, F.; Yu, M.; Chen, S.; Fan, Q.; Xi, Y.; Duan, G.E. coli Enterotoxin LtB Enhances Vaccine-Induced Anti-H. pylori Protection by Promoting Leukocyte Migration into Gastric Mucus via Inflammatory Lesions. *Cells* **2019**, *8*, 982. [CrossRef]
39. Safety Study of Chimeric Vaccine to Prevent ETEC Diarrhea-Full Text View. Full Text View-ClinicalTrials.gov. (n.d.). Retrieved 23 February 2022. Available online: <https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01644565?term=ltb&cond=Diarrhea&draw=2&rank=1> (accessed on 23 August 2022).
40. Maciel, M., Jr.; Bauer, D.; Baudier, R.L.; Bitoun, J.; Clements, J.D.; Poole, S.T.; Smith, M.A.; Kaminski, R.W.; Savarino, S.J.; Norton, E.B. Intradermal or Sublingual Delivery and Heat-Labile Enterotoxin Proteins Shape Immunologic Responses to a CFA/I Fimbria-Derived Subunit Antigen Vaccine against Enterotoxigenic Escherichia coli. *Infect. Immun.* **2019**, *87*, e00460-19. [CrossRef]
41. Maciel, M., Jr.; Smith, M.; Poole, S.T.; Laird, R.M.; Rollenhagen, J.E.; Kaminski, R.W.; Wenzel, H.; Bourgeois, A.L.; Savarino, S.J. Evaluation of the reactogenicity, adjuvanticity and antigenicity of LT(R192G) and LT(R192G/L211A) by intradermal immunization in mice. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0224073. [CrossRef]
42. Svennerholm, A.M.; Lundgren, A.; Leach, S.; Akhtar, A.; Qadri, F. Mucosal Immune Responses Against an Oral Enterotoxigenic Escherichia coli Vaccine Evaluated in Clinical Trials. *J. Infect. Dis.* **2021**, *224*, S821–S828. [CrossRef]
43. Mlcochova, P.; Kemp, S.A.; Dhar, M.S.; Papa, G.; Meng, B.; Ferreira, I.A.T.M.; Datir, R.; Collier, D.A.; Albecka, A.; Singh, S.; et al. SARS-CoV-2 B.1.617.2 Delta variant replication and immune evasion. *Nature* **2021**, *599*, 114–119. [CrossRef]

AVANCES ACTUALES EN EL ÁREA DE BIOFARMACÉUTICOS FABRICADOS CON ALGAS

Palabras clave: *Chlamydomonas reinhardtii*; transformación de cloroplastos; ingeniería genética; administración oral; *Schizochytrium sp.*; vector viral.

6. Introducción

Los productos biofarmacéuticos son moléculas complejas de origen biológico utilizadas para promover la salud humana o animal en esquemas profilácticos o terapéuticos; incluidas vacunas, anticuerpos, hormonas, factores de coagulación, enzimas, factores de crecimiento y citoquinas [1]. El término "biofármacos" se refiere a los productos farmacéuticos que, en contraste con la amplia categoría de productos biológicos, se producen en procesos biotecnológicos basados en el uso como huésped de expresión a un organismo modificado genéticamente. El desarrollo de plataformas de producción de biofármacos abarca los siguientes pasos generales: (i) desarrollo de clones genéticamente modificados capaces de producir la molécula de interés en cantidades convenientes, (ii) evaluación de rendimientos y funcionalidad, (iii) procesamiento *upstream* o corriente arriba donde se produce la propagación de la biomasa en biorreactores para acumular la proteína recombinante, y (iv) procesamiento *downstream* o corriente abajo donde se realiza normalmente la recuperación y purificación del producto recombinante para obtener usualmente formulaciones inyectables. Un esquema de los pasos del desarrollo, se muestran en la Figura 1.

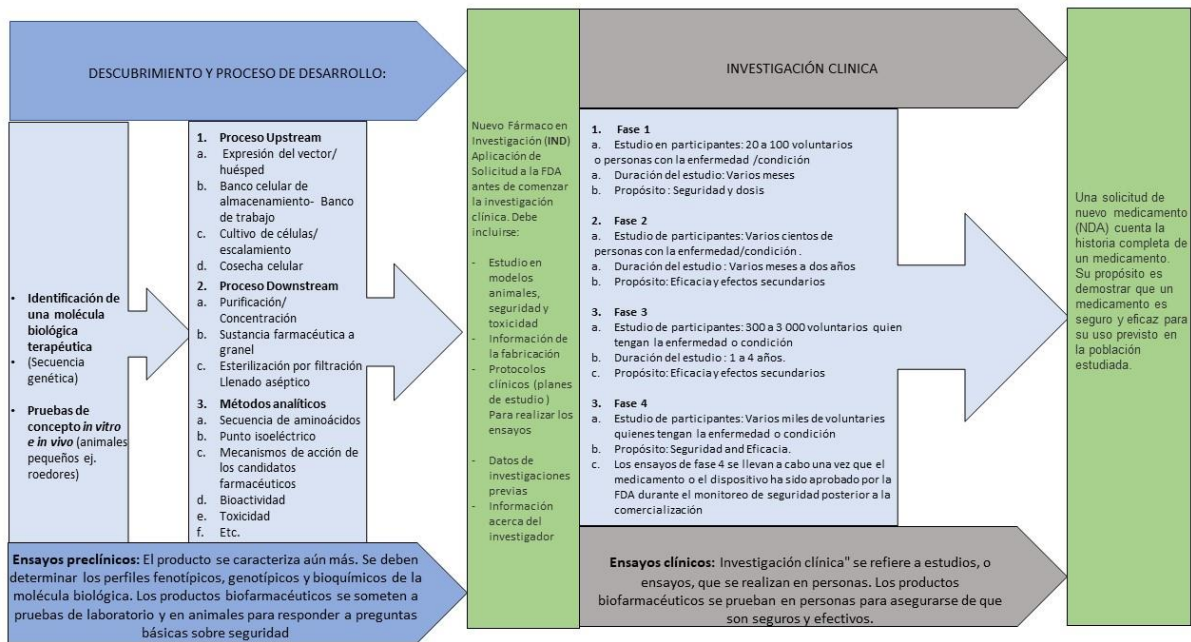


Figura 1. Diagrama de desarrollo de productos biofarmacéuticos e hitos regulatorios

Los biofármacos difieren de los fármacos sintéticos en varios aspectos, como naturaleza del producto, fuente del agente activo, criterios de bioequivalencia, identidad, estructura, métodos de fabricación, composición, dosificación, formulación, manipulación, derechos de propiedad intelectual, normativa legal y su comercialización [2]. Por ejemplo, a diferencia de los medicamentos químicos comunes, los biofármacos basados en proteínas poseen una estructura compleja que los hace propensos a la microheterogeneidad, ya que pueden ser modificados de varias maneras por el huésped (por ejemplo, glicosilación y fosforilación diferenciales). Por lo tanto, el huésped seleccionado para producir un biofármaco específico debe ser validado individualmente para garantizar la producción de moléculas seguras y plenamente funcionales [3]. Las diferencias biológicas que se producen en los distintos huéspedes de expresión, así como las condiciones durante el proceso de fabricación, que provocan cierto grado de variabilidad en el biofármaco.

Los biofármacos se producen principalmente en células de mamíferos, bacterias, células de insectos y levaduras como huéspedes de expresión [4,5]. Estos sistemas tienen una productividad adecuada que satisface las demandas del mercado, pero se

enfrentan a algunas limitaciones. Por ejemplo, aunque las células CHO constituyen la línea celular de mamífero huésped de mayor relevancia empleada para la producción de biofármacos importantes y complejos, como los anticuerpos monoclonales [4]. Esta línea celular tiene un costo de producción elevado (medios de cultivo y sistemas de fermentación) y un riesgo de contaminación con virus o priones. Lo que hace necesaria una purificación y un control de calidad estrictos [6]. Otras de las desventajas de la producción de proteínas en líneas celulares de mamíferos son sus complejos requerimientos nutricionales, su crecimiento lento, vulnerabilidad y su relativamente alto tiempo de producción. En cuanto a los huéspedes bacterianos, *E. coli* es la principal bacteria utilizada para la producción de biofármacos y aunque el costo de las operaciones *upstream* son relativamente bajos en comparación con los cultivos celulares de insectos y mamíferos (por ejemplo, el medio de cultivo para bacterias es unas 200 veces más barato que el medio utilizado para el cultivo de células de mamíferos) y en este sistema se puede llegar a altas productividades. Este sistema no se pueden producir productos biofarmacéuticos complejos, ya que la naturaleza procariota de esta bacteria no ofrece la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales complejas (por ejemplo, la glucosilación) [7]. Además, de requerir modificaciones postraduccionales, los biofármacos fabricados con *E. coli* requieren una purificación estricta debido a la contaminación por endotoxinas (principalmente lipopolisacárido). Las líneas celulares de insectos también se han usado con éxito en la producción biofarmacéutica, con la ventaja, sobre los sistemas bacterianos, de que se efectúan modificaciones postraduccionales. A diferencia de las líneas celulares de mamíferos, las células de insectos son menos exigentes y crecen a mayores densidades. Sin embargo, las células de insecto provocan variaciones en los patrones de glicosilación y el medio de cultivo es caro, lo que aumenta el costo de producción biofarmacéutica [8].

A pesar de que durante las últimas 5 décadas se han producido biofármacos en favor de la salud humana y animal, existe una necesidad permanente de buscar plataformas de producción alternativas para superar las limitaciones antes señaladas. Así pues, es

muy deseable contar con nuevas plataformas que faciliten el proceso de producción y las etapas de formulación para reducir el costo de los biofármacos y hacerlos seguros y accesibles.

7. Objetivo: Presentar una revisión que comprende una perspectiva actualizada que abarca las estrategias de expresión de proteínas, una recopilación de biofármacos funcionales producidos en algas y las empresas que invierten en esta tecnología.

8. Resultados

8.1 Las microalgas son huéspedes favorables para la producción biofarmacéutica

Las microalgas eucariotas constituyen un grupo diverso de organismos cuyas propiedades las convierten en huéspedes de gran interés para la producción y la posterior administración oral de biofármacos [9]. A diferencia de los huéspedes convencionales, las microalgas son microorganismos unicelulares que pueden cultivarse en medios de cultivo de muy bajo costo (costo estimado de 0.002 USD/L [10]); especialmente en el caso de las algas fotosintéticas en las que la luz solar estimula la producción de biomasa requiriendo un mínimo de nutrientes en el sistema, disponiendo de fuentes de luz complementarias se pueden evitar las variaciones en la intensidad de la luz debidas a las variaciones estacionales [11]. Esto reducirá sustancialmente el costo de producción asociado a los cultivos celulares de mamíferos e insectos. Se espera que la producción de biofármacos elaborados con algas represente un ahorro similar al estimado para las plataformas basadas en plantas, que representan entre el 2 y el 10 % del costo de la fermentación microbiana o el 0.1 % del costo de los cultivos celulares de mamíferos [12,13].

Algunas especies de algas sirven actualmente como fuente de complementos alimenticios que no requieren una purificación rigurosa, ya que dichas especies no producen compuestos tóxicos. De este modo, las algas pueden utilizarse como huéspedes que facilitan la producción de biofármacos, ya que carecen de sustancias perjudiciales de carácter endógeno, a diferencia de los sistemas mamíferos o

bacterianos, en los que existe el riesgo de contaminación por virus/priones en el caso de los sistemas mamíferos o la presencia de endotoxinas en el caso de los sistemas bacterianos. Por lo tanto, las especies de algas pueden proponerse de modo factible como biofabricas seguras que carecen de agentes patógenos humanos [14].

(1) Las especies de microalgas estudiadas hasta ahora en este campo son las siguientes: *Chlamydomonas reinhardtii*, una microalga fotosintética de agua dulce utilizada como modelo en biología [15]. *Phaeodactylum tricornutum*, diatomea, una microalga fotosintética, con un caparazón sólido de sílice [16]; *Dunaliella salina*, una microalga fotosintética marina (halófila) [17]; *Chlorella vulgaris*, una microalga fotosintética de agua dulce [18]. y *Schizochytrium sp.*, una especie singular clasificada actualmente como microalga marina no fotosintética (heterótrofa) [19]. Al contrario de los sistemas bacterianos, las microalgas eucariotas pueden realizar complejas modificaciones postraduccionales que dan lugar a moléculas funcionales. Por ejemplo, *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) posee un cloroplasto que produce disulfuro isomerasas, chaperonas [20] y peptidil propil isomerasas (PPlasas) para formar puentes de disulfuro [21]; Además, dispone de la maquinaria para la síntesis eficiente de proteínas codificadas por el núcleo a través de complejas modificaciones postraduccionales que tienen lugar principalmente en el sistema de endomembranas [22]. En el caso de la glicosilación, modificación crítica para muchos biofármacos, no se dispone por el momento de una caracterización detallada a este aspecto para los biofármacos fabricados con algas. Sin embargo, se espera que se produzcan avances en este campo a corto plazo, ya que algunos grupos ya están trabajando en la elucidación de este aspecto [23]. Además, hay que tener en cuenta que la expresión de anticuerpos en cloroplastos, en los que no se produce glicosilación, ha hecho posible la producción de moléculas funcionales, aunque carezcan de glicosilación [24]. Otra ventaja interesante de muchas microalgas consiste en una vez más en su inocuidad, lo que

permite utilizar la célula completa como vehículo de administración oral, evitando el proceso de purificación y reduciendo así drásticamente el costo de producción. Sin embargo, este enfoque requiere un diseño especial de la molécula de interés, ya que, en general, la mucosa intestinal no absorbe bien los biofármacos [25]. Se ha propuesto que la bioencapsulación en la célula del alga protege el biofármaco de la degradación enzimática en el tracto gastrointestinal, pero al mismo tiempo permite la liberación posterior de la molécula para su biodisponibilidad. Los biofármacos producidos a partir de algas y administrados por vía oral no requerirán una etapa de purificación, ya que las algas pueden actuar como vehículos seguros de administración oral [26]. Teniendo en cuenta que las etapas de purificación representan hasta el 80 % del costo de producción de los productos biofarmacéuticos [27]; este método hará que los biofármacos elaborados a partir de algas sean muy accesibles para los sistemas de salud, algo que se necesita encarecidamente en los países en vías de desarrollo [28]. Otra ventaja esencial de las algas es la producción de valiosos compuestos endógenos que incluyen ácidos grasos poliinsaturados y polisacáridos [29]. Es bien sabido que tales compuestos ejercen bioactividades (es decir, efectos inmunomoduladores), por lo que la célula de microalga podría modular de forma positiva la actividad del biofármaco administrado actuando como mucoadhesivo para mejorar la absorción del biofármaco o como agente inmunoestimulador para mejorar la inmunogenicidad de la vacuna [30]. Resulta sorprendente que algunas especies de microalgas hayan demostrado la capacidad de secretar proteínas en medios de cultivo, lo que puede facilitar enormemente *la purificación de biofármacos para formulaciones parenterales* [31]. Este principio se ha demostrado en *Phaeodactylum tricornutum* [32], *C. reinhardtii* [33,34] y *Schizochytrium sp* [35]. La Tabla 1 resume las características de las microalgas y compara con las de otros huéspedes de expresión.

8.2. Las algas pueden modificarse genéticamente para producir biofármacos

El primer paso en el proceso de desarrollo de la producción de biofármacos a partir de algas consiste en diseñar el gen que codifique el biofármaco y clonarlo para construir un vector de expresión que permita desarrollar las clonas de algas transformadas. Para ello es necesario un conocimiento detallado de la biología molecular de las algas (secuencias reguladoras como promotores y terminadores [36,37], péptidos señal [38], sitios de inserción en el genoma [39], etc.) para expresar con éxito los biofármacos funcionales. La expresión nuclear y la basada en cloroplastos pueden aplicarse para la producción de biofármacos, cada alternativa tiene sus características y limitaciones que deben considerarse caso por caso en función de las características del biofármaco de interés (es decir, los requisitos en términos de glicosilación, ensamblaje multimérico y secreción de proteínas); cada uno de estos procedimientos conduce a contextos distintos en términos de procesamiento de proteínas. El cloroplasto es un organelo presente en las algas eucariotas fotosintéticas donde se producen varias vías biosintéticas. Por ejemplo, en este organelo se produce la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos e isoprenoides. El cloroplasto posee un genoma circular (plastoma) y las maquinarias transcripcional y traduccional para sintetizar proteínas. De hecho, a diferencia de los huéspedes bacterianos, el cloroplasto de *C. reinhardtii* posee chaperonas [3], peptidil propilisomerasas (PPIasas) [21] y proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) [40]. Que posibilitan la síntesis adecuada de proteínas complejas que requieren enlaces disulfuro para su correcto plegamiento [41].

La habilidad de expresar genes organizados en operones co-transcritos es otra característica interesante del cloroplasto [42]. La expresión basada en cloroplastos ofrece una elevada productividad de proteínas debido a una mayor expresión derivada del elevado número de copias de los genomas transformados por cloroplasto y una ausencia generalizada de silenciamiento génico sin efectos de posición; la integración es dirigida al sitio y mediada por recombinación homóloga [43]. Una limitación a tener en cuenta para los biofármacos expresados en cloroplastos consiste en la ausencia de

modificaciones postraduccionales complejas (por ejemplo, glicosilación) que son importantes para algunos biofármacos; como la eritropoyetina [44] y los anticuerpos dirigidos a mediar en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos [45]. Además, hay que tener en cuenta que la secreción de proteínas no es posible en la expresión basada en cloroplastos. Los rendimientos actuales en la expresión de cloroplastos se sitúan normalmente en el intervalo 0.02-2 % de proteína soluble total (TSP) (~0.03-3 mg/L de medio de cultivo). Un ejemplo destacado es el caso de amiloide A de la leche bovina (MAA); producida en *C. reinhardtii* con rendimientos de 3.28 mg/L de medio de cultivo [46]. Así, muchos autores se han centrado en el empleo de la expresión basada en el cloroplasto como el enfoque más alentador en este campo [47].

En comparación, la expresión de proteínas codificadas por vía nuclear es un panorama diferente, ya que las proteínas pueden dirigirse a compartimentos celulares específicos que podrían modificar los rendimientos y afectar al procesamiento de las proteínas. Por ejemplo, dirigir la proteína al retículo endoplásmico permite acceder a la maquinaria de glicosilación y a la ruta de secreción; además, las proteínas pueden dirigirse a cuerpos proteicos [48]. Otra posibilidad consiste en la secreción de la proteína recombinante, lo que permite una fácil recuperación y purificación de los biofármacos [33]. Por otro lado, las señales de retención permiten almacenar el biofármaco en el lumen del RE. Por lo tanto, el enfoque de expresión debe elegirse caso por caso en función del tipo de producto que se esté desarrollando. Sin embargo, conseguir un mayor rendimiento proteínico sigue siendo un gran reto cuando se utilizan plataformas basadas en algas. El desarrollo de nuevas herramientas y métodos para hacer frente a esta necesidad es un campo de investigación activo y en los párrafos siguientes se resumen algunos avances recientes fundamentales en este aspecto.

Aunque la manipulación genética está bien establecida en *C. reinhardtii*, la capacidad de expresión robusta y fiable de transgenes a partir del genoma nuclear ha supuesto un reto; observándose bajos rendimientos proteicos [49]. Los mecanismos moleculares que limitan la expresión en el genoma nuclear del gen de interés (GOI) en *C. reinhardtii* no se conocen completamente. Sin embargo, dado que la regulación de la expresión

génica del genoma nuclear de *C. reinhardtii* es un proceso complejo con numerosos niveles intrínsecos de regulación, entre los posibles mecanismos se incluyen el silenciamiento génico, el procesamiento inadecuado del ARN, la inestabilidad del transcrito y la inestabilidad de los productos proteicos [36]. Se han desarrollado varias estrategias para superar estas limitaciones, incluida la generación de cepas mutantes con capacidad de expresión mejorada (es decir, cepas UVM de *C. reinhardtii*), identificación de promotores adecuados para dirigir la transcripción fuerte de genes heterólogos, construcción de promotores híbridos, uso de promotores inducibles y optimización de genes basada en el uso de codones [37,49-51]. En los párrafos siguientes se presenta una recopilación de los avances más recientes en este sentido.

Se ha propuesto que una expresión deficiente del transgén se deriva de un silenciamiento transcripcional severo, independientemente de la posición genómica [52]. El silenciamiento de genes es un proceso en el que la metilación del ADN tiene importantes implicaciones. Se ha reportado que una metiltransferasa de ADN (MET I) está implicada en el silenciamiento de genes en algas y en la expresión de la proteína GFP (VENUS) en cepas mutantes nulas de *C. reinhardtii* MET I. tuvieron más expresión que *Chlamydomonas* cepa silvestre [53]. Un método para vencer los mecanismos epigenéticos que causan una expresión génica escasa consiste en el desarrollo de cepas mutantes obtenidas por mutagénesis UV, que condujeron a la generación de la cepa UVM11 con mayor capacidad de expresión de transgenes; permitiendo rendimientos que fueron aproximadamente 10 veces superiores a los rendimientos habituales alcanzados con los métodos convencionales de expresión nuclear [54]. Este planteamiento se ha experimentado en combinación con la optimización de codones. Barahimipour *et al.* [49] evaluaron la capacidad de expresión de las variantes de los genes P24 y *nptII* que codifican la misma secuencia de aminoácidos, pero difieren en el uso de codones; utilizando la cepa de expresión mutante UVM11 y la cepa de tipo silvestre de *C. reinhardtii*. El artículo demostró que una variante del gen P24 con codón optimizado, introducida en la cepa UVM11, permitió alcanzar niveles de acumulación de proteína recombinante de hasta el 0.25

% de la proteína celular total. Sin embargo, no se utilizó ninguna cepa de tipo silvestre para atribuir el aumento a la cepa UMV11. Más aún, en combinación con una cepa de expresión, un gen *nptII* resintetizado se convierte en un gen marcador seleccionable muy eficiente que permite la selección de clones de algas transgénicas con alta frecuencia [49].

Otro método para aumentar el rendimiento proteico se centra en la presencia de intrones endógenos en el transcrito. Dong *et al.* [36] observaron que el promotor del gen del transporte intraflagelar endógeno 25 (*IFT25*) que contiene intrones, junto con su promotor, condujeron eficientemente la expresión de un gen de fusión compuesto por el gen *IFT25* que contiene intrones y un ADNc codificado con codones optimizados para la GFP, lo que llevó a un rendimiento mayor (2.5 veces) que el logrado con el promotor quimérico convencional HSP70A-RBCS2. A partir de esta observación, se construyó un vector de expresión en el que el promotor y el gen *IFT25*, que contiene un intrón, se fusionaron al gen de interés con la secuencia 2A intermedia, la cual se deriva del virus de la fiebre aftosa (FMDV) y facilita un proceso de "autodestrucción" durante la traducción, promoviendo la liberación del IFT25 y de la proteína de interés por separado. Este método permitió expresar cDNAs de codones optimizados que codifican GFP, xilanasas 1 de *T. reesei*, y LbCpf1 de la bacteria *Lachnospiraceae* ND2006; logrando una liberación eficiente de las proteínas objetivo con los siguientes rendimientos: 0.68, 0.69 y 0.49 % de TSP, respectivamente. Recientemente, Baier *et al.* [55] demostraron conocimientos inéditos sobre el mecanismo de splicing efectivo de intrones insertados artificialmente en secuencias de transgenes eucariotas. Se observó que las inserciones sistemáticas del primer intrón de la subunidad pequeña 2 de la ribulosa-1,5 bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (*rbcS2i1*) en el gen sesquiterpenos sintasa con codones optimizados (Pogostemon cablin Benth patchoulol sintasa, PcPs) ejercían un efecto notable sobre la expresión del transgén. Con este método se consiguió multiplicar por más de 100 veces la abundancia de ARNm y los rendimientos alcanzaron 10-15 ng/30 µg de proteína soluble total (0.03-0.05 %) y 5 ng/30 µg de

proteína celular total (0.02 %). En general, la abundancia de ARNm se correlacionó con la producción de proteínas.

La secreción de proteínas se ha empleado para aumentar el rendimiento de las proteínas recombinantes en microalgas. Ramos-Martinez *et al.* [56] estudiaron la capacidad de una secuencia señal putativa de la gametolisina de *C. reinhardtii* para mejorar la secreción de la proteína amarilla fluorescente Venus. Además, durante el diseño de la proteína se incluyeron glicomódulos sintéticos compuestos por repeticiones en tándem de serina y prolina (n = 20) para aumentar el rendimiento proteico. Tales glicomódulos (SP)_n están O-glicosilados con polisacáridos arabinogalactanos unidos a residuos Pro hidroxilados (Hyp) y favorecen la estabilidad de la proteína [57]. Bajo esta estrategia se logró una producción de 15 mg/L de proteína recombinante. El uso de glicomódulos también mejoró la estabilidad proteolítica de la proteína (proteólisis con tripsina), con una vida media 17 veces más larga para la proteína transportadora (SP)₂₀ [56]. Teniendo en cuenta que los virus son una fuente habitual de elementos genéticos para la expresión heteróloga eficiente de proteínas en varios sistemas, la atención se ha centrado en el desarrollo de vectores basados en virus para microalgas. Mediante el uso de *Schizochytrium sp.* como hospedador de expresión, Bañuelos-Hernández *et al.* [58] han reportado un vector geminiviral basado en el *begomovirus Ageratum enation* virus. El sistema de expresión, denominado Algevir, se basa en la expresión inducible impulsada por el promotor AlcA, que se activa tras la adición de etanol en un mecanismo mediado por la proteína AlcR. La prueba de concepto se realizó *en Schizochytrium sp.* expresando una proteína viral compleja (la proteína GP1 del ebolavirus Zaire con rendimientos de hasta 1.2 mg por gramo de biomasa en peso fresco) y una subunidad de toxina bacteriana (subunidad B de la enterotoxina termolábil de *E. coli* con rendimientos de hasta 0.12 mg por gramo de biomasa en peso fresco); los cuales se alcanzaron en un periodo de una semana [58]. Estudios complementarios permitieron producir vacunas candidatas contra el virus del Zika y el Alzheimer [25,59]. Por consiguiente, Algevir se propone como un sistema favorable que permite producir proteínas codificadas nuclearmente a altos

niveles en un breve periodo de tiempo (una semana en comparación con varias semanas necesarias para los enfoques de transformación estable); con una expresión inducible que hace posible la producción de proteínas recombinantes tóxicas. Llama la atención que un estudio reciente haya probado que la expresión nuclear inducible puede ser alcanzada en *C. reinhardtii* utilizando el sistema AlcR-PalcA, sin que la productividad de este sistema se haya reportado hasta el momento [51].

Estos logros recientes en el campo de la ingeniería genética de microalgas añaden más potencial a la producción farmacéutica, ya que la combinación de cepas mejoradas y vectores de expresión de nueva generación podría aumentar aún más el rendimiento proteínico. Otra herramienta de gran potencial para la ingeniería genética de microalgas es el caso de la edición dirigida del genoma utilizando endonucleasas guiadas por ARN; una herramienta emergente en biotecnología de algas. Últimamente, los sistemas CRISPR-Cas se han convertido en una herramienta muy popular en el campo de la biotecnología de las algas, permitiendo el *knock-in*, *knock-out* y *knock-down* de los genes deseados; con aplicaciones en la producción de lípidos y la mejora de la productividad de la biomasa. La aplicación de esta tecnología a la producción de productos biofarmacéuticos es una vía interesante que hay que explorar [60]. Se prevé que esta tecnología permitirá dirigir la inserción del transgén en "lugares de aterrizaje seguros", lo que dará lugar a una expresión predecible y estable.

8.3. Métodos en desarrollo para definir el procesamiento de las fases upstream

A pesar de que las algas se cultivan en medios de cultivo de bajo costo y se han desarrollado algunos sistemas de biorreactores, los procesos para producirlas a escala piloto (100 L) o a mayor escala (1000 L) así como la optimización de las condiciones de cultivo y la automatización requieren aún un desarrollo importante para aplicaciones biofarmacéuticas. La experiencia adquirida en la producción de algas para la obtención de aceite, pigmentos y otros compuestos valiosos constituye un precedente formidable para implementar la producción de biofármacos [61]. En la actualidad, algunas especies de algas se producen a mayor escala para su aplicación industrial. Por ejemplo, *Schizochitrium sp.* se cultiva en un medio relativamente rico basado en agua

de mar, por lo que su producción no interfiere con las fuentes de agua dulce utilizadas para la agricultura. Por supuesto, el objetivo ideal es utilizar algas fotosintéticas cultivadas en fotobiorreactores para utilizar medios de cultivo más simples y baratos en los que la luz solar estimule la síntesis de biomasa. Sin embargo, la producción a gran escala en fotobiorreactores cerrados se enfrenta a algunos retos relacionados con la irradiación eficiente de la luz y, al respecto, varios grupos están estudiando cómo mejorar este aspecto.

El grupo dirigido por Mayfield está realizando estudios fundamentales sobre la producción a gran escala de productos biofarmacéuticos elaborados a partir de algas. Lograron producir amiloide bovino A (MAA) en *C. reinhardtii* cultivado en condiciones de invernadero utilizando bolsas de plástico de 100 L; dando lugar a concentraciones de hasta 2.27 mg/L de cultivo (1.39 % de TSP), sin embargo, dichas concentraciones variaron en función de la irradiación lumínica diferencial causada por la posición de las bolsas en invernadero [46]. Algunos autores se han concentrado en la optimización de las condiciones lumínicas de los cultivos para aumentar el rendimiento en proteínas y biomasa. Carrera-Pacheco *et al.* [62] reportaron el efecto de la luz continua versus ciclos de luz/oscuridad; así como la intensidad de la luz en la expresión de dos proteínas recombinantes: GFP y una proteína de fusión lisina-GFP bacteriana (GFP-PlyGBS). Determinaron las condiciones optimizadas de producción de proteínas para condiciones fotoautotróficas, mixotróficas y heterotróficas. La producción de proteínas se vio afectada por el período de luz (6-24 h/día), la intensidad luminosa (0-450 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$) y la condición trófica. Las condiciones heterótropas mostraron rendimientos más bajos de ambas proteínas recombinantes debido a tasas reducidas de crecimiento a pesar de tener una alta concentración de proteínas por célula. Las condiciones mixotróficas mostraron los rendimientos más altos para GFP (4 mg/L día) bajo luz constante a 35 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$ y GFP-Ply GBS (0.4 mg/L.día) bajo un periodo de luz de 15 h/día y 35 $\mu\text{E}/\text{m}^2\cdot\text{s}$. En el caso de GFP-PlyGBS, el aumento máximo de la concentración de proteínas celulares fue de ~24 veces y de ~10 veces el rendimiento total de proteínas en comparación con las condiciones de luz constante (~200

$\mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}$). Los mayores rendimientos en condiciones fotoautótrofas se obtuvieron con un periodo de luz de 9 h/día, con un rendimiento de GFP de 1.2 mg/L día y un rendimiento de GFP-Ply GBS de 0.42 mg/L día. Esto representó un aumento de ~ 5 veces en la concentración de proteína celular para GFP-Ply GBS en comparación con las condiciones de luz constante ($\sim 200 \mu\text{E}\cdot\text{m}\cdot\text{s}$). Este reporte destaca que, además de los enfoques de ingeniería genética, el procesamiento previo es fundamental para aumentar la productividad. Del mismo modo, algunos autores han propuesto utilizar la *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 como modelo, empleando condiciones mixotróficas y una estrategia de alimentación por lotes para aumentar la productividad de la biomasa. Se observó un aumento de 3 veces en el rendimiento de biomasa cuando se aplicaron condiciones mixotróficas, mientras que el método de alimentación por lotes aumentó el rendimiento en un 50 % [63].

El cultivo a gran escala de algas podría verse enormemente beneficiado si se redujera la contaminación en los biorreactores, por lo que es deseable adoptar procedimientos que eviten el crecimiento de otros organismos para combatir la contaminación microbiana. Loera-Quezada *et al.* [64] y Sandoval Vargas *et al.* [65] han desarrollado una estrategia basada en un entorno selectivo que favorece los monocultivos de linajes de algas seleccionadas en sistemas abiertos. Estos procedimientos se basan en el hecho de que la mayoría de los organismos vivos sólo pueden utilizar el fosfato (Pi) como fuente de fósforo, pero no otras formas químicas reducidas de P como el fosfito (Phi) o el hipofosfito (HPhi) [66]. Así, mediante la incorporación de nuevos genes, las algas seleccionadas adquieren la capacidad de utilizar Phi como fuente de P, teniendo una ventaja competitiva sobre sus competidores cuando se cultivan en un medio que contiene Phi como única fuente de P. Loera-Quezada *et al.* [64] demostraron que *C. reinhardtii* asimilaba Phi expresando el gen *ptxD* de *Pseudomonas stutzeri* WM88, que codifica una enzima fosfito oxidorreductasa capaz de oxidar Phi en Pi. Los autores demostraron que las líneas de *C. reinhardtii* modificadas por ingeniería nuclear tienen la capacidad de utilizar Phi como fuente de P y predominar en el sistema de cultivo en presencia de contaminantes naturales o aun cuando se inoculan deliberadamente con

otras especies de algas. En un enfoque similar pero dirigido a la expresión del cloroplasto, Sandoval-Vargas *et al.* [65] reportaron que la asimilación de Phi también puede lograrse expresando un gen *ptxD* optimizado en codones en *C. reinhardtii*. Estos son posibles métodos para la producción de productos biofarmacéuticos a gran escala, reduciendo el riesgo de contaminación en el biorreactor.

8.4. El procesamiento downstream es un desarrollo pendiente

El procesamiento *downstream* incluye varias operaciones unitarias para obtener una formulación a partir de la biomasa de algas. Se realiza la cosecha y la ruptura celular para extraer el biofármaco, posteriormente se lleva a cabo la purificación para obtener una molécula pura y formular tratamientos parenterales. En el caso de los biofármacos que se secretan al medio de cultivo, se colecta el sobrenadante y se concentra para proceder a la purificación, lo que resulta más sencillo que utilizar lisados celulares debido al menor contenido de contaminantes.

Los primeros indicios sobre la definición de métodos de purificación para proteínas de interés específicas son prometedores. Por ejemplo, se ha expresado osteopontina fosforilada en *C. reinhardtii* y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico utilizando hidroxapatita cerámica como adsorbente; observándose una separación eficaz de la molécula de interés con respecto a las impurezas principales de proteínas fosforiladas de la célula huésped, como la Rubisco [67]. Aunque otros autores han descrito la purificación de productos biofarmacéuticos elaborados a partir de algas, todos estos estudios se han realizado a escala de laboratorio y no se han identificado estudios detallados sobre el procesamiento posterior a escala piloto o industrial. No obstante, se han explorado otros organismos fotosintéticos, como musgos y plantas superiores, y esa información será valiosa para aplicar la tecnología al caso de las algas. Ejemplos de esfuerzos en esta dirección son una vacuna contra la gripe y un anticuerpo contra el VIH [68].

Debido a que muchas especies de algas carecen de compuestos tóxicos y, de hecho, son comestibles, pueden utilizarse como vehículos de administración oral, lo que

permite simplificar drásticamente el procesamiento posterior, ya que la biomasa puede liofilizarse e incluirse en cápsulas de gelatina para obtener un producto de administración oral sin necesidad de complejos procesos de purificación durante la producción. Este planteamiento dará lugar a terapias de bajo costo basadas en cápsulas que contengan biomasa de algas liofilizada, similares a las propuestas en el caso de las vacunas de origen vegetal [69]. Cabe señalar, no obstante, que este enfoque es viable para los biofármacos diseñados para ser absorbidos eficazmente por la mucosa intestinal o aquellos cuya acción terapéutica radica en el tracto gastrointestinal.

8.5. Resumen de biofármacos expresados en microalgas

Varios grupos de investigadores de todo el mundo están trabajando en la creación de plataformas para producir biofármacos en especies de algas. La Figura 2 describe la clasificación y el desarrollo de biofármacos expresados en microalgas hasta la fecha, siendo el desarrollo de vacunas el tema más explorado. La Tabla 2 muestra un resumen de las vacunas contra enfermedades humanas.

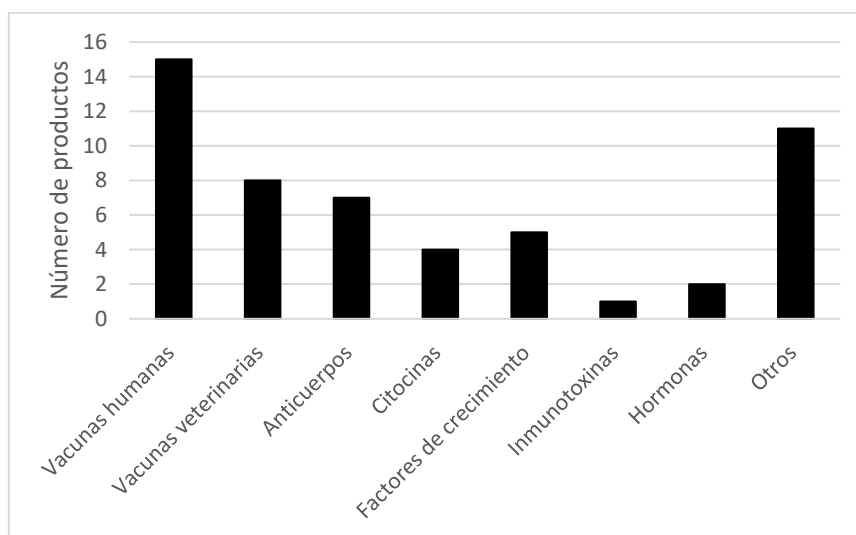


Figura 2. Clasificación actual y número de productos biofarmacéuticos expresados en algas.

Algunas de las vacunas humanas candidatas se han evaluado en modelos animales. Algunas de las vacunas candidatas más esperanzadoras contra enfermedades

humanas son: (i) una vacuna producida en *C. reinhardtii* contra la alergia al cacahuete, que se expresó en el cloroplasto y fue capaz de proteger a ratones contra la anafilaxia inducida por el cacahuete tras la inmunización intraperitoneal (i.p.) [70]; (ii) una vacuna producida en *C. reinhardtii* contra la malaria, que se expresó en el cloroplasto y fue capaz de reducir la parasitemia en ratones sometidos a un esquema basado en la inmunización por vía i.p. y oral [32]; (iii) una vacuna contra el virus del papiloma humano producida en *C. reinhardtii*, que se expresó en el cloroplasto y fue capaz de proporcionar protección antitumoral en ratones tras inmunización subcutánea (s.c.) [71]; (iv) una vacuna contra la gripe producida en *Schizochytrium sp.*, que se basaba en la expresión nuclear y fue capaz de proteger completamente a los ratones contra un desafío viral tras la inmunización parenteral [35]; y (v) una vacuna basada en una proteína quimérica capaz de inducir respuestas humorales contra el virus Zika [59]. Hasta la fecha no se han realizado evaluaciones clínicas de los biofármacos elaborados a partir de algas.

La Tabla 3 presenta una recopilación de vacunas fabricadas con algas para uso veterinario. En este caso se diseñó una vacuna producida en *Dunaliella salina* diseñada a nivel nuclear contra el virus del síndrome de la mancha blanca; fue capaz de reducir significativamente la mortalidad de cangrejos de río inmunizados por vía oral [81]. La producción de anticuerpos e inmunotoxinas es otra tendencia importante en el campo de los biofármacos elaborados a partir de algas. Esta aplicación es de gran relevancia, ya que se trata del tratamiento del cáncer y otras enfermedades no transmisibles. La Tabla 4 resume los avances reportados hasta el momento. Entre los hallazgos prometedores de esta aplicación se encuentran: (i) una inmunotoxina dirigida a CD22 que porta dominios de la Exotoxina A (PE40) de *Pseudomonas aeruginosa*, que se expresó en el cloroplasto de *C. reinhardtii* y demostró que específicamente y reduce la viabilidad de los linfomas de células B [82]; y (ii) un anticuerpo de camélido dirigido contra la neurotoxina botulínica, que se produjo en el cloroplasto de *C. reinhardtii* y se detectó en el intestino de ratones tratados por vía oral [83].

Otro caso interesante es la producción de enzimas líticas, que constituyen una alternativa viable al uso de antibióticos que se enfrenta a debido al incremento constante de multirresistencia desarrollada por las bacterias. Stoffels *et al.* [90] produjeron, en el cloroplasto de *C. reinhardtii*, las endolisinas Cpl-1 y Pal de *Streptococcus pneumoniae*. Las endolisinas producidas por las algas mostraron actividad antibacteriana contra *S. pneumoniae*, incluidos aislados clínicos con resistencia a la penicilina y al cotrimoxazol. En cuanto a la producción de citoquinas y factores de crecimiento de crecimiento se han identificado menos estudios en la literatura (Tabla 5) Dos ejemplos de factores de crecimiento funcionales fabricados en microalgas incluyen la proteína B1 del grupo de alta movilidad (producida en *C. reinhardtii* por transformación del cloroplasto); su actividad funcional fue demostrada en un ensayo de quimiotaxis de fibroblastos por Rasala *et al.* [91] y el factor de crecimiento endotelial vascular humano (VEGF), producido en *C. reinhardtii* transformado nuclearmente, que promovió la migración de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos formación de vasos sanguíneos en ratones [92].

La Tabla 6 presenta un resumen de otros biofármacos producidos en microalgas hasta la fecha. Los informes de especial interés en este grupo de moléculas de interés incluyen un enfoque para expresar un ARN de doble cadena (ds) dirigido al virus de la cabeza amarilla (YHV) del camarón letal en *C. reinhardtii*, que fue capaz de aumentar en un 22 % la supervivencia de camarones postlarvales tras un desafío con YHV [95]. Kim *et al.* [96] lograron la expresión del gen de la hormona del crecimiento de la platija (fGH) en *Chlorella ellipsoidea*, lo que aumentó en un 25 % la tasa de crecimiento de los peces alimentados con esta microalga. *Nannochloropsis oculata* también ha sido modificada para producir lactoferricina (LfB), que proporcionó protección a los peces medaka contra el *Vibrio parahaemolyticus* [97]

8.6. Opinión de los expertos

A la luz de los resultados esperanzadores y de la labor de investigación constante sobre este tema, las perspectivas son atractivas y en los párrafos siguientes se

señalan los principales retos que plantea la explotación de las algas como "biofábricas" de productos biofarmacéuticos.

Aunque las especies de algas han demostrado su capacidad biosintética de proteínas complejas y funcionales, los rendimientos asociados aún pueden mejorarse en comparación con otros sistemas emergentes, como las plantas, en las que los vectores virales han permitido rendimientos de hasta 5 g por kg de biomasa. De este modo, la optimización del rendimiento proteínico debería aplicarse a un amplio grupo de productos biofarmacéuticos. La aplicación de estas tecnologías permitirá realizar avances significativos en los próximos años con el fin de aumentar la productividad de las plataformas basadas en algas. En particular, el sistema Algevir es un enfoque prometedor que ofrece altos rendimientos y expresión inducible [58]. Sin embargo, aunque este sistema permite la obtención de una concentración razonable de proteínas en un corto periodo de tiempo, no se generan cepas de almacenamiento ya que este sistema se basa en la expresión transitoria y el *Agrobacterium* residual hace inviable el uso de la biomasa para la administración oral. Por lo tanto, una perspectiva interesante para la tecnología Algevir consiste en desarrollar transformantes estables, que se sometan a un cultivo a largo plazo en el que se elimine por completo el *Agrobacterium* de la biomasa para la producción directa de formulaciones orales. El objetivo más atractivo para este campo es el desarrollo de tratamientos orales que ofrezcan un bajo costo (ya que se evita la purificación y la formulación compleja) y una administración sencilla (evitando la necesidad de personal capacitado y dispositivos esterilizados) [71]. Perseguir estos propósitos implica lidiar con la dilución y degradación parcial del biofármaco en el tracto gastrointestinal; así como lograr una absorción eficiente del biofármaco para alcanzar los tejidos diana, que pueden comprender la submucosa para la inducción de la respuesta inmune o incluso el compartimento sistémico y tejidos distantes. A pesar de que se ha demostrado la administración de anticuerpos intactos en ratones y la inducción de respuestas inmunoprotectoras mediante biofármacos orales elaborados a partir de algas

[82,107,108], en general la caracterización de las formulaciones orales es deficiente, por lo que existe una gran necesidad de avanzar en este campo.

Otro aspecto clave que debe explorarse en detalle es la glicosilación de biofármacos en sistemas basados en algas, ya que esto podría influir en su funcionalidad. Por ejemplo, la glicosilación diferencial puede ser responsable de conferir actividad inmunogénica al biofármaco, favoreciendo así la producción de anticuerpos neutralizantes [109,110], aumentando la captación del biofármaco por las células diana [111] o potenciando la inmunogenicidad del antígeno vacunal. Por ello, los avances en la caracterización de las vías de glicosilación en microalgas serán críticos para definir la conveniencia de producir biofármacos con patrones de glicanos específicos; garantizando su eficacia, a la vez que se evitan reacciones no deseadas (inmunogenicidad). Debe tenerse en cuenta que incluso en las líneas celulares de mamíferos la glicosilación debe optimizarse ya que, en comparación con las células humanas, se producirán algunas diferencias en los patrones de glicosilación [113].

La gran mayoría de los informes que tratan de biofármacos producidos en microalgas se describen a escala de laboratorio (matraz); por lo tanto, para mejorar el potencial de desarrollo de esta tecnología existe una necesidad urgente de ampliar estos modelos a biorreactores. Entre los aspectos fundamentales a estudiar se encuentran la optimización de los medios y las mejoras en el diseño de los fotobiorreactores. Por ello, la implementación y optimización del bioprocesamiento bajo buenas prácticas de fabricación (GMP) es un objetivo pendiente. Aunque se ha investigado mucho sobre las algas para la producción de biocombustibles, las normas para la producción de biofármacos son distintas de las de la producción de biocombustibles o alimentos. Dado que los biorreactores suelen ser los sistemas cerrados, estos dispositivos son los más apropiados para la producción de biofármacos a partir de algas. En este sentido, el diseño y el funcionamiento de los biorreactores son aspectos críticos en el proceso de producción. El cultivo de algas en biorreactores ofrece varias ventajas que incluyen la posibilidad de contención total (para mejorar la bioseguridad) y el control adecuado de los parámetros de crecimiento para optimizar la producción de biomasa

y la productividad. De este modo se favorece la aprobación regulatoria. Sin embargo, los nuevos planteamientos de cultivo basados en la asimilación de Phi abrirán alternativas para la producción de biofármacos. Los avances actuales en el cultivo y los métodos y técnicas obtenidos de producción industrial de algas para productos comerciales favorecerán enormemente la implementación de sistemas para la producción de biofármacos. Dado que las algas constituyen un vasto y diverso grupo de especies, el potencial de mejora de la para producir biofármacos en estos huéspedes es indudablemente enorme y la exploración de más especies para este fin es motivo de atención en el campo de la biotecnología. Por ejemplo, las especies de algas extremófilas pueden proporcionar plataformas de producción robustas que siguen sin explorarse.

Tras el resultado satisfactorio de las evaluaciones de prueba de concepto, el objetivo de lograr la comercialización de biofármacos elaborados a partir de algas en beneficio de la población, especialmente en países en vías de desarrollo, requiere varias etapas sucesivas en las que es necesaria la colaboración entre diversos grupos. La mayor parte de la investigación en desarrollo en este sector se lleva a cabo en instituciones académicas, por lo que la relación entre el mundo académico y la industria será fundamental para atraer inversores y acelerar la protección de la propiedad intelectual. Las patentes son incentivos esenciales para fomentar la innovación; en particular para el caso de los productos biofarmacéuticos, ya que estos requieren procesos largos, costosos y arriesgados para llevar a cabo la investigación y el desarrollo. Esta importancia se sigue manteniendo a pesar de los numerosos cambios en el panorama del mercado y de las patentes [114]. Otro objetivo crítico consiste en completar la evaluación preclínica mediante evaluaciones de seguridad y toxicológicas. Además, es muy necesario realizar ensayos clínicos, de los que no se ha publicado nada hasta la fecha sobre productos biofarmacéuticos obtenidos a partir de algas. De nuevo, estos objetivos dependerán críticamente del establecimiento de una asociación con la industria y las agencias gubernamentales, ya que se requieren grandes inversiones para abordarlos. Es importante destacar que la experiencia adquirida en la evaluación

clínica de productos biofarmacéuticos fabricados en organismos estrechamente relacionados con las algas, como las plantas, será de gran utilidad, sobre todo para definir el marco normativo. Tabla 3. Marco regulador [115-117].

Puesto que ha comenzado la era de la producción de biosimilares (sustitutos genéricos), existen grandes posibilidades de ampliar la producción de moléculas terapéuticas conocidas en las algas [118]. Los antecedentes sólidos sobre la eficacia y la amplia experiencia clínica con productos innovadores harán que el desarrollo de biosimilares sea un camino más fácil [119]. Sin embargo, debido a la gran complejidad molecular de los biofármacos, el proceso de desarrollo y aprobación de los biosimilares es complicado. El principal reto es que podrían generarse variaciones en el biosimilares, ya que no se dispone de información sobre los procesos del originador. Por este motivo, se necesitan requisitos reglamentarios que garanticen la biosimilitud, comparabilidad e intercambiabilidad con respecto a la eficacia y la seguridad [120]. Tanto la Unión Europea como los Estados Unidos han elaborado documentos de orientación para los biosimilares que darán lugar a bioterapéuticos tan seguros y eficaces como el producto innovador [121]. Generar y cumplir un marco normativo para los biofármacos fabricados con algas (biosimilares o productos innovadores) será un objetivo clave para lograr la aprobación de la FDA, la Unión Europea o las agencias reguladoras locales.

El reto en este ámbito es lograr que la industria adopte las plataformas basadas en algas para la producción de biofármacos, desarrollar un marco normativo y obtener las aprobaciones necesarias. Aunque el número de empresas dedicadas a la producción de biofármacos a partir de algas es limitado, se ha observado un aumento en los últimos cinco años. La Tabla 7 muestra las empresas que trabajan en el desarrollo de productos basados en algas recombinantes para promover la salud humana o animal. El uso de plantas para la producción de biofármacos constituye una referencia clave para este campo, ya que durante el desarrollo de dicha tecnología se afrontaron retos similares. Tras casi cuatro décadas de investigación, se han desarrollado sistemas de expresión eficientes para plantas con rendimientos de hasta 5 g/kg de biomasa en

peso fresco y producción conforme a las buenas prácticas de fabricación [122]. Recientemente se ha publicado un modelo económico de fabricación de algunos biofármacos de origen vegetal [12]. Hasta la fecha, sólo se ha aprobado el uso en humanos de un biofármaco elaborado a partir de plantas, y algunos otros se encuentran en fase de ensayo clínico [123]. La experiencia adquirida con los biofármacos de origen vegetal facilitará sin duda la posibilidad de que las algas obtengan la aprobación reglamentaria.

9. Conclusiones

En conclusión, el uso de algas para producir e incluso distribuir productos biofarmacéuticos ofrece una alternativa para afrontar los costos elevados de purificación, almacenamiento en frío, transporte, y la corta vida útil de los productos biofarmacéuticos actuales en beneficio de la salud pública, especialmente en los países de bajo poder adquisitivo.

Tablas

Tabla 1. Características de los principales y emergentes huéspedes para la producción de productos biofarmacéuticos. Adaptado de *Yan et al.* (2016).

Huésped	Costo de la biomasa	ingeniería genética	Tasa de crecimiento	Productividad	Capacidad de modificación postraduccional	¿Posible fuente de endotoxinas o patógenos?	Posible vehículo de administración	Experiencia en producción industrial
<i>E. coli</i>	++	++++	++++	++++	+	Si	No	++++
Levaduras	++	++++	++++	+++	+++	No	Si	++++
Células de mamífero	++++	++++	++	++	++++	Si	No	++++
Células de insecto	++++	+++	++++	++	++++	No	Si	++++
Plantas	+	++++	+	+	+++	No	Si	++++
Algas	+	++	++++	++	++++	No	Si	++

Tabla 2. Biofármacos producidos en microalgas para combatir enfermedades humanas.

Nombre de microalga	Antígeno expresado	Tipo de transformación	Vía de administración/Adyuvante	Aplicación prevista (enfermedad o terapia)	Resultados principales	Referencia
<i>Dunaliella Salina</i>	Virus de la hepatitis B antígeno (HBsAg)	Estable, Nuclear	No presentado	Hepatitis B	No se realizaron ensayos de inmunización en	[72].

					ratones. Los rendimientos obtenidos fueron de hasta 3.11 ng HBsAg/ mg de soluble proteína	
<i>C. reinhardtii</i>	Ácido glutámico humano decarboxylase 65 (hGAD65)	Estable, cloroplasto	No presentado	Diabetes tipo I	Proliferación de células del bazo de ratones NOD Los rendimientos alcanzaron 0.25-0.3 % de la proteína soluble total	[73].
<i>C. reinhardtii</i>	Antígeno basado en una fusión del Terminal C desde el Apical Mayor antígeno (AMA1), o Superficie Mayor Proteína (MSP1), con el gránulo almidón atado sintasa (GBSS)	Estable, cloroplasto	Oral / LTB i.p. / Freund's	Malaria	Reducción de la parasitemia en ratones, sueros de animales inmunizados fue activo en ensayos <i>in vitro</i> contra varias especies plasmodiales	[74].
<i>C. reinhardtii</i>	Proteína quimérica que transporta el Unión a fibronectina D2 dominio de <i>Estafilococo aureus</i> y la toxina B del cólera subunidad	Estable, cloroplasto	Oral / ninguno	Infección de <i>Staphylococcus aureus</i>	Inducido específico mucosa y respuestas inmunes sistémicas en ratones. Protegido contra un letal desafío con <i>S. áureo</i> (80 % de supervivencia)	[107].
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> proteínas de superficie 25 (Pfs25) y 28 (Pfs28)	Estable, cloroplasto	i.p. / Freund's	Malaria	Ambos antígenos fueron inmunogénicos en ratones y, tras la inmunización con Pfs25, se produjeron anticuerpos <i>in vitro</i> que reaccionaron y bloquearon la transmisión	[75].
<i>C. reinhardtii</i>	Mutado Oncoproteína E7 de la Humana Virus del papiloma	Estable, cloroplasto	s.c. / QuilA	Virus del papiloma humano tipo 16	Producido anti-E7 IgG específico respuestas y Protección tumoral	[71].
<i>Schizochytrium sp.</i>	Hemaglutinina recombinante del virus de la influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1)	Estable, Nuclear	Parenteral / Solo o más Addavax (a base de escualeno)	Influenza	Ratones totalmente protegidos de un desafío viral letal	[35].
<i>C. reinhardtii</i>	Una proteína de fusión que contiene luciferasa y la butirilcolinesterasa humana (huBuChE)	Estable, nuclear	No presentado	Intoxicaciones por plaguicidas	Los rendimientos alcanzados fueron de 0.4 % de la proteína total soluble. La proteína de fusión era enzimáticamente inactiva	[76].

<i>C. reinhardtii</i>	Proteína quimérica de la nucleocápside antígeno de Virus de la hepatitis B (HBcAg) fusionado a angiotensina II	Estable, Nuclear	No presentado	Hipertensión	No se realizaron ensayos de inmunización. Rendimientos alcanzados 0.05 % de la proteína soluble total	[77].
<i>C. reinhardtii</i>	Antígeno del VIH p24	Estable, Nuclear	No presentado	VIH	Rendimientos alcanzados 0.25 % del total proteína celular	[49].
<i>C. reinhardtii</i>	Proteína quimérica que transporta el Epítipo P210 de humano ApoB100 y el toxina B del cólera subunidad (CTB:p210)	Estable, cloroplasto	Oral / ninguno	Aterosclerosis	Se obtuvo anticuerpos séricos anti-p210 en ratones y la respuesta persistió durante al menos 80 días	[78].
<i>C. reinhardtii</i>	Ara h 1 y Ara h 2 (CrAra h 1 y CrAra h 2); y una versión truncada de CrAra h 1 (aminoácidos 171–586)	Estable, cloroplasto	i.p. / ninguno	Alergia al cacahuate	Dominio de Ara h1 núcleo protegido de la anafilaxia inducida por cacahuate en ratones	[70].
<i>C. reinhardtii</i>	Antígeno del VIH P24	Estable, nuclear	No presentado	HIV-1	La combinación de un codón optimizado gen sintético y La cepa de expresión condujo a la acumulación de hasta el 0.25 % de la proteína celular total con una sola copia del gen en el genoma.	[49].
<i>C. reinhardtii</i>	El principal alérgeno del polen del abedul, Bet V1	Estable, cloroplasto	No presentado	Inmunoterapia con alérgenos	Los rendimientos oscilaron entre el 0.01 y el 0.04 % de la proteína soluble total. El Bet v1 fabricado con microalgas mostró perfiles de unión de anticuerpos similares con anticuerpos monoclonales murinos y con IgE humana.	[79].
<i>Schizochytrium sp.</i>	GP1 del virus del Ébola Zaire y la subunidad de la toxina bacteriana B de la termolábil de <i>E. coli</i> (LTB)	Transient	No presentado	Ebola virus	Los rendimientos alcanzaron hasta 1.25 mg/g FW para GP1 y 0.12 mg/g FW para LTB	[58].
<i>C. reinhardtii</i>	Proteína de fusión portadora de un candidato para la vacuna pre eritrocítica y bloqueadora de la transmisión, fusionada con interleucina-2 humana (IL-2) como adyuvante	Estable, cloroplasto	No presentado	Malaria	Los rendimientos alcanzaron hasta el 1.5% de proteína soluble total y la proteína se plegó correctamente	[80].

<i>Schizochytrium</i> sp.	Proteína quimérica que lleva un epítipo del receptor de productos finales de glicosilación avanzada (RAGE) fusionado con la subunidad B de <i>E. coli</i> termo enterotoxina lábil (LTB), LTB:RAGE	Transitoria	No presentado	Enfermedad de Alzheimer (EA)	Rendimientos alcanzados hasta 380 µg/g peso fresco. El antígeno LTB:RAGE mostró actividad antigénica	[25].
<i>Schizochytrium</i> sp.	Proteína quimérica portadora de 3 epítopos de la proteína de la envoltura del virus ZIKA fusionada con la subunidad B de la toxina del cólera	Transitoria	Oral / LTB s.c. / Freund's	ZIKA virus	Produjo respuestas humorales significativas en ratones inmunizados oralmente a una magnitud mayor a las inducidas por inmunización s.c	[59].

Tabla 3. Biofármacos producidos en microalgas para combatir enfermedades animales.

Nombre de microalga	Antígeno expresado	Tipo de transformación	Vía de administración / Adyuvante	Aplicación prevista (enfermedad o terapia)	Resultados principales	Referencia
<i>C. reinhardtii</i>	VP1 proteína fusionada con la subunidad B de la toxina del cólera (CTB)	Estable, cloroplasto	No presentado	Virus de la fiebre aftosa (FMDV)	Rendimientos alcanzados hasta 3 % de proteína soluble total, los ensayos ELISA confirmaron la antigenicidad	[84].
<i>C. reinhardtii</i>	Proteína estructural E2	Estable, cloroplasto	Oral / none s.c. / Freund's	Virus de la peste porcina clásica (VPP)	Rendimientos alcanzados 1.5-2 % de la proteína soluble total. Respuestas humorales producidas en ratones inmunizados vía s.c.	[85].
<i>C. reinhardtii</i>	Antígeno tipo 2	Estable, cloroplasto	No presentado	Enfermedad asociada al circovirus porcino (PCVAD)	Patente en desarrollo	[86].
<i>Dunaliella salina</i>	Proteína VP28	Estable, nuclear	Oral / ninguno	Virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV)	Reducción de la mortalidad del 40 % en cangrejos de río	[81].

					inmunizados por vía oral	
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	Antígeno IbpA DR2	Estable, nuclear	s.c. / Quil A	<i>Histophilus somni</i> Enfermedad respiratoria bovina	Produjo respuestas humorales bajas en ratones	[87].

Tabla 4. Anticuerpos e inmunotoxinas producidos en microalgas.

Nombre de la microalga	Expresión de anticuerpos o inmunotoxinas	Tipo de transformación	Ensayo de inmunización: Vía de administración / Adyuvante	Aplicación prevista (enfermedad o terapia)	Resultado principal	Referencia
<i>C. reinhardtii</i>	Cadena grande del anticuerpo contra el herpes Virus simplex glicoproteína D anticuerpo contra el herpes Virus simplex glycoprotein D	Estable, cloroplasto	No presentado	Herpes Virus simplex	La expresión alcanzó hasta el 1 % de proteína soluble total. La afinidad específica del anticuerpo a las proteínas del virus del herpes se demostró mediante ELISA	[10].
<i>C. reinhardtii</i>	Anticuerpo monoclonal humano IgG1 83K7C	Estable, cloroplasto	No presentado	PA83 Antígeno del ántrax	La afinidad del anticuerpo recombinante fue similar al anticuerpo expresado en células de mamíferos	[24].
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Anticuerpo monoclonal humano IgG1 CL4mAb	Estable, cloroplasto	No presentado	Hepatitis B	El monoclonal humano Anticuerpo IgG1 contra La hepatitis B alcanzó niveles de expresión del 9 % de la proteína soluble total	[88].
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Anticuerpo monoclonal humano IgG CL4mAb	Estable, cloroplasto	No presentado	Hepatitis B	Eficiente expresión de proteínas y secreción del anticuerpo IgG recombinante. Los rendimientos alcanzaron 2.5 µg/mL de cultivo medio	[32].
<i>C. reinhardtii</i>	Inmunotoxina (αCD22PE40) que comprende el dominios II y III de exotoxina A (PE40) de <i>Pseudomonas</i>	Estable, cloroplasto	No presentado	Cancer	Las inmunotoxinas expresadas fueron capaces de unirse y reducir la viabilidad de los linfomas de células B	[83].

	<i>aeruginosa</i> y el fragmento de scFv CD22					
<i>C. reinhardtii</i>	Anticuerpos de camelido cadena pesada solamente (VHH)	Estable, cloroplasto	Oral / ninguno	Neurotoxina botulínica	Los anticuerpos producidos por algas neutralizaron la neurotoxina botulínica serotipo A (BoNT/A). Después de la inmunización de ratones, los anticuerpos neutralizantes resistieron el tracto gastrointestinal	[82].
<i>P. tricornutum</i>	Anticuerpo anti-hepatitis B	Estable, nuclear	Ensayos in vitro	Hepatitis B	El anticuerpo recombinante se une a los receptores Fcγ (FcγRI con baja afinidad y FcγRIIIa con alta afinidad)	[89].

Tabla 5. Citoquinas y factores de crecimiento producidos en microalgas.

Nombre de la microalga	Citocinas o factores de crecimiento expresados	Tipo de transformación	Ensayos con animales:	Aplicación prevista (enfermedad o terapia)	Resultado principal	Referencia
<i>Dunaliella salina</i>	Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)	Estable, cloroplasto	No presentado	Diferentes objetivos	Patente en desarrollo	[93].
<i>C. reinhardtii</i>	Necrosis tumoral relacionados con los factores inducción de apoptosis ligando a (TRAIL)	Estable, cloroplasto	No presentado	Células tumorales e infectadas por virus células	Se demostró la expresión por Western blot y rendimientos alcanzados de hasta el 0.67 % de la proteína soluble total	[94].
<i>C. reinhardtii</i>	Interferón B1 humano (IFN- β 1)	Estable, cloroplasto	No presentado	Esclerosis múltiple	Baja expresión de la proteína recombinante	[91].
<i>C. reinhardtii</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Estable, cloroplasto	No presentado	Enfisema pulmonar, disfunción eréctil o depresión	La expresión en algas mostró y rendimientos similares a los observados en <i>E. coli</i> , 2.5 % de proteína soluble total	[91].
<i>C. reinhardtii</i>	Alta movilidad proteína del grupo B1 (HMGB1)	Estable, cloroplasto	No presentado	Célula endotelial activación, estromagénesis, reclutamiento y activación de	La proteína recombinante demostró ser funcional en fibroblastos	[91].

				células inmunes innatas y maduración de células dendríticas	Ensayo de quimiotaxis	
<i>C. reinhardtii</i>	Factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF)	Estable, nuclear	Experimentos <i>in vivo</i> en ratones hembra sin pelo Skh1	Terapia para regeneración	El VEGF recombinante promovió la migración de células endoteliales y la formación de vasos sanguíneos después de una semana, sin embargo, no aumentó significativamente la tasa de vascularización sobre la herida	[92].

Tabla 6. Otros biofármacos producidos con microalgas.

Nombre de la microalga	Proteína expresada	Tipo de transformación	Ensayos de biactividad realizados	Aplicación (enfermedad o terapia)	Resultado principal	Referencia
<i>Chlorella vulgaris</i> cepa C-27 y <i>Chlorella sorokiniana</i> ATCC-22521	Hormona de crecimiento (hGH)	Estable, protoplastos	No presentada	Deficiencia de hGH	La proteína recombinante se secretó al medio de cultivo en rendimiento promedio de 200–600 ng/mL	[98].
<i>Chlorella ellipsoidea</i> cepa (nrm -4)	El neutrófilo de conejo péptido-1 (NP1)	Estable, nuclear	Ensayos de biactividad <i>in vitro</i> contra <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	Actividad antibacteriana y antifúngica en acuicultura	Los rendimientos alcanzaron hasta 11.42 mg / L y la funcionalidad peptídica contra <i>E. coli</i> mostró ser fuerte a solo 5 µg/mL	[99]
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Gen de la hormona del crecimiento de la platija (fGH)	Estable, protoplasto	Los alevines de platija fueron alimentados con el transformado <i>C. ellipsoidea</i>	Growth hormone used in aquaculture	Los peces alimentados con las algas transformadas mostraron un aumento del 25 % en la tasa de crecimiento después de un tratamiento de 30 días	[96]
<i>C. reinhardtii</i>	Eritropoyetina (Epo)	Estable, nuclear	No presentados	Anemia	Muy baja expresión de Epo (100 µg/L en el sobrenadante o 0.03 % del peso seco)	[100]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Lactoferricina (LfB)	Estable, nuclear	Peces Medaka fueron alimentados con el	Enfermedad infecciosa en acuicultura	Mejora de la tasa de supervivencia ante el desafío de <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	[97]

			<i>N. oculata</i> transformada			
<i>C. reinhardtii</i>	El decimocuarto dominio de fibronectina humana tipo III (14FN3) y el décimo dominio de fibronectina tipo III (10FN3)	Estable, cloroplasto	No presentados	Imitación de anticuerpos en varias aplicaciones.	Los rendimientos fueron de hasta el 3 % de la proteína soluble total para 14FN3, mientras que 10FN3 no se expresó a niveles significativos	[91]
<i>C. reinhardtii</i>	Eritropoyetina (Epo)	Estable, cloroplasto	No presentados	Anemia	Epo no se expresó en cantidades significativas	[91]
<i>C. reinhardtii</i>	Antígenos VapA y AcrV de patógeno bacteriano de pescado <i>Aeromonas salmonicida</i>	Estable, cloroplasto	No presentados	Enfermedades infecciosas en la acuicultura	Los mejores rendimientos se obtuvieron utilizando una cepa mutante de <i>C. reinhardtii</i> (0.3 % TSP para VapA y 0.8 % TSP para AcrV)	[101]
<i>Dunaliella salina</i>	Inhibidor de la tripsina Kunitz de soja (SKTI)	Estable, nuclear	No presentados	Antiinflamatorio y anticancerígeno agente	Los rendimientos alcanzaron hasta el 0.68 % de la proteína soluble total	[102]
<i>C. reinhardtii</i>	ARN bicatenario (ds) dirigido al letal virus de la cabeza amarilla del camarón (YHV)	Estable, nuclear	Alimentación de camarones post larvales	Antiviral contra virus de camarón	Aumento de la supervivencia del camarón en un 22 % ante un desafío con YHV	[95]
<i>C. reinhardtii</i>	Hormona de crecimiento humana	Estable, cloroplasto	Ensayos <i>In vitro</i> en la línea celular de linfoma de rata Nb2-11	Deficiencia de hormona de crecimiento humano, síndrome de Turner, etc.	Inducido un aumento de 8 veces en el número de células	[103]
<i>C. reinhardtii</i>	Endoglucanasa bacteriana (CelK1, Glicohidrolasa, familia 5)	Estable, cloroplasto	No presentados	Aplicaciones potenciales en procesos agroindustriales como la producción de bioetanol y biogás	Muy baja expresión proteica, 0.003 % de proteína soluble total, no se determinó actividad específica	[104]
<i>C. reinhardtii</i>	Péptido 3x Mitquitin-A (incluye 3 repeticiones seguidas del péptido)	Estable, nuclear	Ensayos de bioactividad <i>In vitro</i> contra <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157, y <i>Salmonella enteritidis</i>	Péptido antimicrobiano contra hongos, virus, parásitos y bacterias	Inhibió el crecimiento de bacterias gramnegativas con potencia moderada (<i>E. coli</i> CMI = 60 µg/mL, y <i>Salmonella enteritidis</i> MIC = 80 µg/mL), mientras que se logró una buena potencia para la bacteria grampositiva <i>L.</i>	[105]

					<i>monocytogenes</i> (CMI: 80 mg/mL)	
<i>C. reinhardtii</i>	Las endolisinas Cpl-1 y Pal, de <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Estable, cloroplasto	Ensayos de actividad <i>In vitro</i> usando cultivos de <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> and <i>S. pyogenes</i>	Agente antibacterial	Rendimiento alcanzado de 1 % TSP. Los extractos de proteínas crudos y purificados demostraron acción anti bacterial contra <i>S. pneumoniae</i> , incluyendo aislados clínicos con resistencia a penicilina y cotrimoxazol	[90]
<i>C. reinhardtii</i>	Factor de crecimiento epidermal (hEGF)	Estable, nuclear	No presentado	Deficiencia en el factor de crecimiento epidermal	Rendimiento alcanzado arriba de 0.25 % de proteína total secretada.	[106]

Table 7. Recopilación de empresas que adoptan plataformas basadas en algas para la producción de biofármacos

Nombre	Sitio	Descripción
TransAlgae	www.transalgae.com	Empresa israelí que desarrolla plataformas basadas en algas para la administración oral de fármacos destinados a la salud animal y la protección de cultivos.
MicroSynbiotix	www.microsynbiotix.com	Empresa irlandesa que desarrolla vacunas orales a base de microalgas para la acuicultura
Axitan	www.axitan.com	Empresa británica que desarrolla vacunas y péptidos comestibles a base de microalgas para la industria zoosanitaria
Mara Renewables Corporation	www.maracorp.ca	Productor atlántico canadiense de bioproductos a base de algas
Triton	www.tritonai.com	Empresa que desarrolla productos a base de algas como suplementos nutricionales y proteínas de la leche humana como la osteopontina
BioGreen Synergy	www.biogreensynergy.com	Empresa estadounidense que desarrolla productos para la acuicultura y la biotecnología marina, así como productos farmacéuticos.



Expert Opinion on Biological Therapy

ISSN: 1471-2598 (Print) 1744-7682 (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/iebt20>

Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field

Sergio Rosales-Mendoza, Karla I. Solís-Andrade, Verónica A. Márquez-Escobar, Omar González-Ortega & Bernardo Bañuelos-Hernandez

To cite this article: Sergio Rosales-Mendoza, Karla I. Solís-Andrade, Verónica A. Márquez-Escobar, Omar González-Ortega & Bernardo Bañuelos-Hernandez (2020): Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field, Expert Opinion on Biological Therapy, DOI: [10.1080/14712598.2020.1739643](https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1739643)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1739643>



Accepted author version posted online: 06 Mar 2020.
Published online: 20 Mar 2020.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 25



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

REVIEW



Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field

Sergio Rosales-Mendoza^{a,b}, Karla I. Solís-Andrade^{a,b}, Verónica A. Márquez-Escobar^{a,b}, Omar González-Ortega^a and Bernardo Bañuelos-Hernández^c

^aFacultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ^bSección de Biotecnología, Centro de Investigación en Ciencias de la Salud y Biomedicina, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México; ^cEscuela de Agronomía y Veterinaria, Universidad De La Salle Bajío, León, México

ABSTRACT

Introduction: The biopharmaceuticals industry demands new production platforms to address several challenges; such as cost reduction to make biologics accessible in low-income countries, safety enhancement of the product, development of products administered by noninvasive routes, and expansion of potential biosimilars and biobetters. Microalgae are emerging hosts for biopharmaceuticals production with the potential to meet such requirements.

Areas covered: Nowadays successful cases on the production of vaccines, antibodies, antimicrobial peptides, growth factors/cytokines, and hormones in algae have been reported. This review comprises an updated outlook covering protein expression strategies, a compilation of functional biopharmaceuticals produced in algae, and companies investing in this technology.

Expert opinion: Key perspectives for the field include optimizing yields, scaling up production and completing preclinical trials. The experience from the field of plant-made biopharmaceuticals is commented as a key reference that will aid in the development of the algae-made biopharmaceuticals field.

ARTICLE HISTORY

Received 20 June 2019
Accepted 4 March 2020

KEYWORDS

Antibodies; *Chlamydomonas reinhardtii*; chloroplast transformation; genetic engineering; oral delivery; *Schizochytrium sp.*; viral vector

1. Introduction

Biopharmaceuticals are complex molecules of biological origin used to promote human or animal health in either prophylactic or therapeutic schemes; they include vaccines, antibodies, hormones, clotting factors, enzymes, growth factors, and cytokines [1]. The term 'biopharmaceuticals' denotes pharmaceuticals that, in contrast to the broad category of biologics, are produced in biotechnological processes based on a genetically engineered organism used as expression host. The development of biopharmaceuticals production platforms comprises the following general steps: (i) development of genetically engineered clones able to produce the target molecule at convenient levels, (ii) assessment of yields and functionality, (iii) upstream processing where the propagation of biomass in bioreactors to accumulate the recombinant protein occurs, and (iv) downstream processing where the recovery and purification of the recombinant product is typically performed to obtain conventional injectable formulations. A graphical description of the developmental path is provided in Figure 1. Biopharmaceuticals differ from synthetic drugs in several aspects including the nature of the product, the source of the active agent, bioequivalence criteria, identity, structure, manufacturing methods, composition, dosing, formulation, handling, intellectual property rights, legal regulations, and marketing [2]. For instance, in contrast to common chemical drugs, protein-based biopharmaceuticals possess a complex structure that makes them prone to microheterogeneity since they can be modified in several ways by the host (e.g. differential glycosylation and phosphorylation). Therefore, the host selected to

produce a specific biopharmaceutical should be individually validated to ensure the production of safe and fully functional molecules [3]. The biological differences that occur in the different expression hosts, as well as the conditions during the manufacturing process, cause a certain degree of variability in the biopharmaceutical.

Biopharmaceuticals are mainly produced in mammalian cells, bacteria, insect cells, and yeasts as expression hosts [4,5]. These systems have appropriate productivity that meets market demands, but face some limitations. For instance although CHO cells constitute the most prominent mammalian cell line host used for the production of relevant and complex biopharmaceuticals such as monoclonal antibodies [4]; this cell line implies high production cost (culture media and fermentation systems) and contamination risk with viruses or prions, which make a stringent purification and quality control a must [6]. Other drawbacks of protein production in mammalian cell lines include complex nutritional requirements, slow growth and fragility, and relatively high production time and cost. Regarding bacterial hosts, *E. coli* is the main bacterium used for the production of biopharmaceuticals and although the upstream processing cost is relatively low when compared to insect and mammalian cell cultures (i.e. culture medium for bacteria is about 200-fold cheaper respect the medium used for mammalian cell culture) and high productivities can be reached; complex biopharmaceuticals cannot be produced in this system since the prokaryotic nature of this bacterium does not offer the ability to perform

Article Highlights

- Algae are attractive hosts for producing biopharmaceuticals due to their singular advantages that include low production cost, lack of toxic compounds in many species, high biosynthetic capacity, and their potential use as oral delivery vehicles.
- Functional vaccines, antibodies, antimicrobial peptides, growth factors/cytokines, and hormones have been produced in algae species thus far.
- Initial studies on scale-up and downstream processing for algae-made biopharmaceuticals have been initiated.
- The current expression technologies allow producing biopharmaceuticals at yields up to 3.28 mg·L⁻¹ of culture medium using chloroplast-based expression.
- The use of viral vectors is a promise strategy to increase protein yields using microalgae-based platforms.

This box summarizes key points contained in the article.

complex post-translational modifications (e.g. glycosylation) [7]. As mentioned earlier many biopharmaceuticals require complex post-translational modifications such as glycosylation and disulfide bridge formation. Moreover, a strict purification is also required for *E. coli*-made biopharmaceuticals due to the contamination by endotoxins (mainly lipopolysaccharide). Insect cell lines have also been successfully applied to biopharmaceutical production with the advantage, over the bacterial systems, that post-translational modifications occur. In contrast to mammalian cell lines, insect cells are less demanding and grow to higher densities. However, insect cells provoke variations in the glycosylation patterns and the culture medium is expensive, which increases the biopharmaceutical production cost [8].

Despite that biopharmaceuticals have been produced during the last 5 decades in the benefit of human and animal health, there is a constant need to look for alternative produc-

tion platforms to overcome the above-commented limitations. New platforms facilitating the production process and the formulation steps are thus highly desirable to decrease the cost of biopharmaceuticals and make them safe and accessible.

2. Microalgae are advantageous hosts for biopharmaceutical production

Eukaryotic microalgae comprise a diverse group of organisms whose properties make them interesting hosts for the production and the eventual oral delivery of biopharmaceuticals [9]. In contrast to conventional hosts, microalgae are unicellular micro-organisms that can be cultivated in very low-cost culture media (estimated cost of 0.002 USD per liter [10]); especially in the case of photosynthetic algae where sun light drives biomass production requiring minimal nutrients in the system, having complementary light sources to compensate variations in light intensity due to season variations [11]. This will substantially decrease the production cost associated with mammalian and insect cell cultures. It is expected that the production of algae-made biopharmaceuticals will represent similar savings to those estimated for plant-based platforms, which represent 2–10% of the cost of microbial fermentation or 0.1% of the cost of mammalian cell cultures [12,13].

Some algal species currently serve as source of dietary compounds not requiring strident purification given that such species do not produce toxic compounds. Thus algae can be used as hosts that facilitate the production of biopharmaceuticals since they lack harmful endogenous compounds, in contrast to mammalian or bacterial systems in which there is a risk of viruses/prions contamination for the former or the presence of endotoxins for the latter. Therefore, algae species

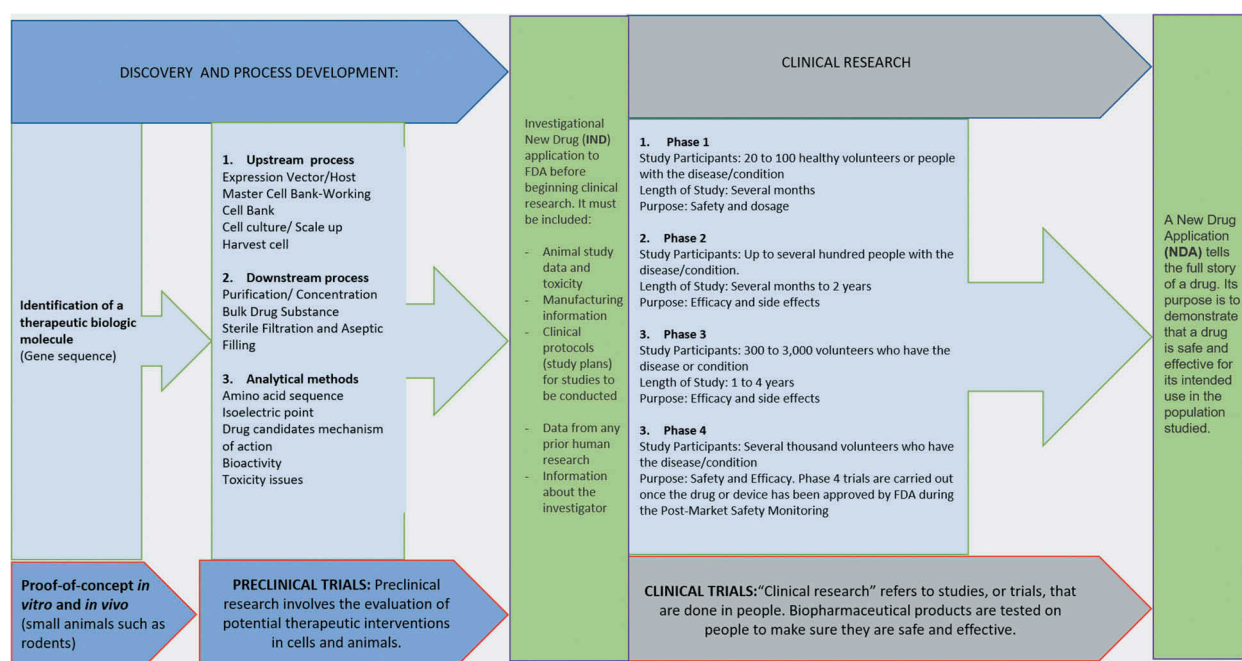


Figure 1. Biopharmaceutical product development diagram and regulatory milestones.

can be realistically proposed as safe biofactories lacking human pathogens [14].

- (1) The microalgae species explored thus far in this field include the following: *Chlamydomonas reinhardtii*, which is a photosynthetic fresh water microalga used as model in biology [15]; *Phaeodactylum tricornutum*, which is a diatom, photosynthetic microalga, having a solid shell made of silica [16]; *Dunaliella salina*, which is a marine (halophile) photosynthetic microalga [17]; *Chlorella vulgaris*, which is a photosynthetic fresh water microalga [18]; and *Schizochytrium sp.*, which is a singular species currently classified as a non-photosynthetic (heterotrophic) marine microalga [19]. In contrast to bacterial systems, eukaryotic microalgae can cope with complex post-translational modification rendering functional molecules. For instance, *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) possesses a chloroplast that produces disulfide isomerases, chaperones [20], and peptidyl propylisomerases (PPlases) to form disulfide bridges [21]; moreover it has the machinery for the efficient synthesis of nuclearly-encoded proteins through complex post-translational modifications mainly occurring in the endomembrane system [22]. In the case of glycosylation, which is a critical modification for many biopharmaceuticals, a detailed characterization in this regard is not available for algae-made biopharmaceuticals thus far. However, progress in this field is anticipated in the short-term as some groups are already working in elucidating this aspect [23]. Moreover it should be also considered that the expression of antibodies in chloroplasts, in which no glycosylation occurs, has allowed producing functional molecules even when they lack glycosylation [24]. Another fascinating advantage of many microalgae resides again in their lack of toxicity, which makes it possible to use the whole cell as the oral delivery vehicle; avoiding the purification process and thus decreasing dramatically the production cost. This goal however requires special designs in the target molecule since biopharmaceuticals are, in general, inefficiently absorbed by the intestinal mucosa [25]. It has been proposed that bioencapsulation into the algal cell protects the biopharmaceutical from enzymatic degradation in the gastrointestinal tract, but at the same time allows for the eventual release of the molecule to become bioavailable. The orally administered algae-made biopharmaceuticals will not require a purification step since algae can act as safe oral delivery vehicles [26]. Considering that the purification steps represent up to 80% of the production cost of biopharmaceuticals [27]; this approach will

make algae-made biopharmaceuticals highly accessible for health systems, which is urgently needed in developing countries [28]. Another key advantage of algae is the production of valuable endogenous compounds that include polyunsaturated fatty acids and polysaccharides [29]. It is well known that such compounds exert bioactivities (i.e. immunomodulatory effects), thus the microalga cell could positively modulate the activity of the delivered biopharmaceutical acting as mucoadhesive to enhance biopharmaceutical absorption or immunostimulatory agents to enhance vaccine immunogenicity [30]. Interestingly some microalgae species have shown the ability to secrete proteins into culture media, which can greatly facilitate the purification of biopharmaceuticals for parenteral formulations [31]. This concept has been proven in *Phaeodactylum tricornutum* [32], *C. reinhardtii* [33,34], and *Schizochytrium sp* [35]. A summary of microalgae characteristics and a comparison with other expression hosts is presented in Table 1.

2.1. Algae can be genetically engineered to produce biopharmaceuticals

The first step on the developmental path for the production of algae-made biopharmaceuticals comprises the design of the gene coding for the biopharmaceutical and its cloning to construct an expression vector that allows developing transformed algae clones. For these goals a detailed knowledge of the algae molecular biology (regulatory sequences such as promoters and terminators [36,37], signal peptides [38], genome insertion sites [39], etc.) is required to successfully express the functional biopharmaceuticals. Nuclear and chloroplast-based expression can be applied for the production of biopharmaceuticals and each alternative has its features and limitations that should be considered in a case by case scenario based on the characteristics of the biopharmaceutical of interest (i.e. requirements in terms of glycosylation, multimeric assembly, and protein secretion); each of these approaches leads to differential contexts in terms of protein processing. The chloroplast is an organelle present in photosynthetic eukaryotic algae where several biosynthetic pathways happen. For instance, the syntheses of fatty acids, amino acids, and isoprenoids occur in this organelle. The chloroplast possesses a circular genome (plastome) and the transcriptional and translational machineries to synthesize proteins. In fact, unlike bacterial hosts, the chloroplast from *C. reinhardtii* possesses chaperones [3], peptidyl propylisomerases (PPlases) [21], and protein disulfide isomerases

Table 1. Features of the main and emerging hosts for the production of biopharmaceuticals. Adapted from Yan et al. 2016 [9].

Host	Biomass cost	Genetic engineering status	Growth rate	Productivity	Post-translational modification capacity	Possible source of endotoxins or pathogens?	Possible delivery vehicle?	Industrial production experience
<i>E. coli</i>	++	++++	++++	++++	+	Yes	No	++++
Yeast	++	++++	++++	+++	+++	No	Yes	++++
Mammalian cells	++++	++++	++	++	++++	Yes	No	++++
Insect cells	++++	+++	++++	++	++++	No	Yes	++++
Plants	+	++++	+	+	+++	No	Yes	++++
Algae	+	++	++++	++	++++	No	Yes	++

(PDIs) [40] that allow proper synthesis of complex proteins requiring disulfide bonds for correct folding [41].

The capability of expressing genes arranged in co-transcribed operons is another interesting feature of the chloroplast [42]. Chloroplast-based expression offers elevated protein productivity due to greater expression derived from the high copy number of the transformed genomes per chloroplast and a general absence of gene silencing with no position effects; the integration is site-directed and mediated by homologous recombination [43]. A limitation to consider for the chloroplast-expressed biopharmaceuticals consists in the lack of complex post-translational modifications (e.g. glycosylation) that are relevant for some biopharmaceuticals; such as erythropoietin [44] and antibodies intended to mediate antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity [45]. In addition, it should be considered that protein secretion is not possible under chloroplast-based expression. Current yields in chloroplast expression are typically in the 0.02–2% of total soluble protein (TSP) range (~0.03–3 mg/L of culture medium). A notable example is the case of Bovine Milk Amyloid A (MAA); produced in *C. reinhardtii* at yields of 3.28 mg/L of culture medium [46]. Thus, many authors are focused on using the chloroplast-based expression as the most promising approach in the field [47].

In contrast, the expression of nuclear-encoded proteins is a different scenario since proteins can be directed to specific cellular compartments that could modify yields and affect protein processing. For instance targeting the protein to the endoplasmic reticulum allows accessing the glycosylation machinery and the secretion route; moreover proteins can be directed to protein bodies [48]. Another alternative consists in the secretion of the recombinant protein, which allows for an easy recovery and purification of the biopharmaceuticals [33]. On the other hand, retention signals allow accumulating the biopharmaceutical in the ER lumen. Therefore, the expression approach should be selected on a case by case basis according to the type of product under development. Nevertheless achieving higher protein yields is still a challenge when using algae-based platforms. The development of new tools and approaches to cope with this need is an active research field and in the following paragraphs some key recent advances in this regard are summarized.

Although genetic manipulation is well established in *C. reinhardtii*, the capacity for robust and reliable transgene expression from the nuclear genome has been challenging; observing low protein yields [49]. The molecular mechanisms limiting the nuclear genome expression of the gene of interest (GOI) in *C. reinhardtii* are not completely understood. However, since the regulation of gene expression from the nuclear genome of *C. reinhardtii* is a complex process with numerous inherent levels of regulation; possible mechanisms include gene silencing, improper RNA processing, transcript instability, and instability of protein products [36]. Several strategies have been developed to overcome these limitations including the generation of mutant strains with improved expression capacity (i.e. UVM *C. reinhardtii* strains), identification of promoters suitable to drive strong transcription of heterologous genes, construction of hybrid promoters, use of inducible promoters, and gene optimization based on codon usage [37,49–51]. In the following paragraphs a compilation of the most recent advances in this regard is presented.

It has been proposed that poor transgene expression is derived from severe transcriptional silencing irrespective of the genomic position [52]. Gene silencing is a process where DNA methylation has important implications. It has been reported that a DNA methyltransferase (MET I) is involved in gene silencing in algae and the expression of the GFP(VENUS) protein in *C. reinhardtii* MET I null-mutant strains was higher than in the *Chlamydomonas* wild type [53]. An approach to overcome the epigenetic mechanisms that cause poor gene expression involves the development of mutant strains obtained by UV mutagenesis, which led to the generation of the UVM11 strain with enhanced capacity for transgene expression; allowing yields that were about 10-fold higher than the typical yields attained under conventional nuclear expression approaches [54]. This approach has been tested in combination with codon optimization. Barahimpour et al. [49] assessed the expression capacity of P24 and *nptII* gene variants that encode the identical amino acid sequence but differ in codon usage; using the mutant expression strain UVM11 and the wild type *C. reinhardtii* strain. The report showed that a codon-optimized P24 gene variant, introduced into the UVM11 strain, led to recombinant protein accumulation levels up to 0.25% of the total cellular protein. However, no wild-type strain was used to attribute the increase to the UVM11 strain. Moreover, in combination with an expression strain, a resynthesized *nptII* gene becomes a highly efficient selectable marker gene that allows selection of transgenic algal clones at high frequency [49].

Another approach to enhance protein yield is based on the presence of endogenous introns in the transcript. Dong et al. [36] showed that the promoter from the intron-containing endogenous intraflagellar transport 25 (IFT25) gene along with its promoter efficiently drove the expression of a fusion gene composed of the intron-containing IFT25 gene and a codon optimized cDNA coding for GFP, which led to a higher yield (2.5-fold) than that achieved with the conventional HSP70A-RBCS2 chimeric promoter. Based on that observation an expression vector was constructed where the promoter and the intron-containing IFT25 gene were fused to the gene of interest with the 2A sequence in between, which is derived from the Foot-and mouth virus (FMDV) and mediates a 'self-cleaving' process during translation; promoting the release of IFT25 and the protein of interest individually. This approach allowed expressing codon-optimized cDNAs encoding GFP, xylanase 1 from *T. reesei*, and LbCpf1 from *Lachnospiraceae* bacterium ND2006; achieving an efficient release of the target proteins with the following yields: 0.68, 0.69, and 0.49% of TSP; respectively. Recently, Baier et al. [55] demonstrated novel insights into the effective splicing mechanism of artificially inserted introns in eukaryotic transgene sequences. Systematic insertions of the first intron of the ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit 2 (*rbcS2i1*) into the codon-optimized sesquiterpene synthase gene (*Pogostemon cablin* Benth patchoulol synthase, PcPs) were found to exert a remarkable effect on transgene expression. Under this approach a more than 100-fold improvement in mRNA abundance was achieved and yields reached 10–15 ng/30 µg of total soluble protein (0.03–0.05%)

and 5 ng/30 µg of total cellular protein (0.02%). Overall the abundance of mRNA correlated with protein yields.

Protein secretion has been applied to increase recombinant protein yields in microalgae. Ramos-Martinez et al. [56] evaluated the ability of a putative signal sequence from *C. reinhardtii* gametolysin to improve secretion of the yellow fluorescent protein Venus. In addition, synthetic glycomodules comprising tandem repeats of serine and proline ($n = 20$) were included during protein design to increase protein yields. Such (SP) n glycomodules are O-glycosylated with arabinogalactan polysaccharides attached to hydroxylated Pro residues (Hyp) and favor protein stability [57]. Under this strategy a production of 15 mg·L⁻¹ of recombinant protein was reached. The use of glycomodules also enhanced the proteolytic protein stability (proteolysis with trypsin), with 17-fold longer half-life for the protein carrying (SP)₂₀ [56].

Considering that viruses are a typical source of genetic elements for efficient heterologous expression of proteins in several systems, the attention has been turned to the development of viral-based vectors for microalgae. By using *Schizochytrium sp.* as expression host, a geminiviral vector based on the begomovirus *Ageratum enation virus* was reported by Bañuelos-Hernández et al. [58]. The expression system, called Algevir, is based on inducible expression driven by the AlcA promoter that is activated upon ethanol addition in a mechanism mediated by the AlcR protein. The proof of concept was provided in *Schizochytrium sp.* by expressing a complex viral protein (the GP1 protein from *Zaire ebolavirus* with yields up to 1.2 mg per gram of fresh weight biomass) and a bacterial toxin subunit (B subunit of the heat-labile *E. coli* enterotoxin with yields up to 0.12 mg per gram of fresh weight biomass); which were achieved in a period of a week [58]. Further studies allowed producing vaccine candidates against Zika virus and Alzheimer [25,59]. Therefore, Algevir is proposed as an advantageous system that allows producing nuclear-encoded proteins at high levels in a short period of time (one week versus several weeks required for stable transformation approaches); with an inducible expression that makes the production of toxic recombinant proteins possible. It is of interest that a recent report has also proven that nuclear inducible expression can be achieved in *C. reinhardtii* by using the AlcR-P_{alcA} system, nonetheless the productivity of such system has not been reported yet [51].

These previous recent advances in the microalgae genetic engineering field add more potential for pharmaceutical production since a combination of improved strains and the next generation expression vectors could lead to further increases in protein yields. Another tool of great potential for microalgae genetic engineering is the case of the targeted genome editing using RNA-guided endonucleases; an emerging tool in algal biotechnology. Recently, CRISPR-Cas systems have become a popular tool in the algae biotechnology field allowing the knock-in, knock-out and knock-down of the desired genes; with applications in lipid production and enhancement of biomass productivity. The application of this technology to the production of biopharmaceuticals is a relevant path to be explored [60]. It is anticipated that this technology will allow targeting the insertion of the transgene into 'safe landing sites'; giving predictable and stable expression.

2.2. Ongoing approaches to define upstream processing

Although algae are grown in low-cost culture media and some bioreactor systems have been developed, the processes to produce them at pilot (100 L) or larger scales (1000 L) for biopharmaceutical applications still require substantial development; such as optimization of culture conditions and automation. The experience gained from the production of algae for obtaining oil, pigments, and other valuable compounds is a formidable precedent to implement the production of biopharmaceuticals [61]. Currently some algae species are produced at larger scale for industrial application. For instance, *Schizochytrium sp.* is grown in a relatively rich medium based on marine water; thus its production does not interfere with fresh water sources used for agriculture. Of course the ideal goal is to use photosynthetic algae grown in photobioreactors to use simpler and cheaper culture media with sunlight driving the synthesis of biomass. However, large scale production in closed photobioreactors faces some challenges related to efficient light irradiation and in this regard several groups are working to improve this aspect.

The group headed by Mayfield is performing seminal studies on the large scale production of algae-made biopharmaceuticals. Bovine Milk Amyloid A (MAA) has been produced in *C. reinhardtii* grown under greenhouse conditions using 100-L plastic bags; leading to concentrations up to 2.27 mg·L⁻¹ of culture (1.39% of TSP), nonetheless these concentrations varied depending on the differential light irradiation caused by the position of the bags in the greenhouse [46]. Some authors have focused on optimizing culture light conditions to enhance protein and biomass yields. Carrera-Pacheco et al. [62] reported the effect of continuous light versus light/dark cycles; as well as light intensity on the expression of two recombinant proteins: GFP and a bacterial lysin-GFP fusion protein (GFP-PlyGBS). Optimized protein production conditions were determined for photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic conditions. Protein yields were influenced by the light period (6–24 h·d⁻¹), light intensity (0–450 µE·m⁻²·s⁻¹), and trophic condition. Heterotrophic conditions showed lower yields of both recombinant proteins due to reduced growth rates, despite having high protein accumulation per cell. Mixotrophic conditions exhibited the highest yields for GFP (4 mg·L⁻¹·d⁻¹) under constant light at 35 µE·m⁻²·s⁻¹ and GFP-PlyGBS (0.4 mg·L⁻¹·d⁻¹) under a light period of 15 h·d⁻¹ and 35 µE·m⁻²·s⁻¹. For GFP-PlyGBS the maximum increase in cellular protein accumulation was ~24-fold and ~10-fold higher in total protein yield when compared to constant light conditions (~200 µE·m⁻²·s⁻¹). The highest yields under photoautotrophic conditions were obtained under a 9 h·d⁻¹ light period, with a GFP yield of 1.2 mg·L⁻¹·d⁻¹ and a GFP-PlyGBS yield of 0.42 mg·L⁻¹·d⁻¹. This represented a ~ 5-fold increase in cellular protein accumulation for GFP-PlyGBS in comparison to constant light conditions (~200 µE·m⁻²·s⁻¹). This report highlights that, besides genetic engineering approaches, the upstream processing is critical to enhance productivity. Similarly, some authors have proposed using *Chlorella sorokiniana* UTEX 1230 as model; using mixotrophic conditions and a fed-batch strategy to increase biomass productivity. A 3-fold increase in biomass yield was observed when mixotrophic conditions were applied, whereas the fed-batch approach increased the yield by 50% [63].

Algae cultivation at large scale could be greatly facilitated by reducing contamination in bioreactors and thus approaches to avoid the growth of other organisms are desirable to overcome microbial contamination. Loera-Quezada et al. [64] and Sandoval-Vargas et al. [65] have developed a strategy based on a selective environment that favors monocultures of selected algal lineages grown in open systems. The approaches are based on the fact that the majority of living organisms can only use phosphate (Pi) as source of phosphorus, but not other reduced chemical forms of P such as phosphite (Phi) or hypophosphite (HPhi) [66]. Thus by introducing new genes the selected algae acquire the capacity of using Phi as P source, having a competitive advantage over competitors when grown on a medium containing Phi as the sole source of P. Loera-Quezada et al. [64] demonstrated that *C. reinhardtii* assimilated Phi by expressing the *ptxD* gene from *Pseudomonas stutzeri* WM88, which encodes a phosphite oxidoreductase able to oxidize Phi into Pi. The authors proved that the nuclear-engineered *C. reinhardtii* lines have the capacity to use Phi as P source and dominate the culture system in the presence of naturally occurring contaminants or even when deliberately inoculated with another algal species. In a similar approach but targeting chloroplast expression, Sandoval-Vargas et al. [65] reported that Phi assimilation can also be achieved by expressing a codon-optimized *ptxD* gene in *C. reinhardtii*. These are possible approaches for the production of biopharmaceuticals at the large scale, decreasing the contamination risk in the bioreactor.

2.3. Downstream processing is a pending development

Downstream processing comprises several operations to obtain a formulation from the algae biomass. Harvest and cell disruption to extract the biopharmaceutical are performed and purification is subsequently conducted to obtain a pure molecule and formulate parenteral treatments. In the case of biopharmaceuticals that are secreted to the culture medium; the supernatant is collected and concentrated to proceed with the purification, which is simpler than using cell lysates due to the lower content of contaminants.

Initial studies on defining purification approaches for specific targets are encouraging. For instance, phosphorylated osteopontin has been expressed in *C. reinhardtii* and purified by anion exchange chromatography using ceramic hydroxyapatite as adsorbent; observing an efficient separation of the target molecule from major phosphorylated host cell protein impurities such as Rubisco [67]. Although other authors have reported the purification of algae-made biopharmaceuticals; all these studies have been performed at the laboratory scale and no detailed studies on the downstream processing at the pilot or industrial scales have been identified. Nonetheless other photosynthetic organisms, e.g. moss and superior plants, have been explored and such information will be valuable to implement the technology for the case of algae. Examples of efforts in this direction comprise a flu vaccine and an antibody against HIV [68].

Since many algae species lack toxic compounds and are in fact edible; they can be used as oral delivery vehicles making possible to dramatically simplify the downstream processing since biomass can be freeze-dried and included in gelatin capsules to obtain a product for oral administration without the need of complex purification processes during production.

This approach will lead to low-cost therapies based on capsules containing freeze-dried algae biomass similar to those proposed in the case of plant-based vaccines [69]. It should be noted however that this approach is viable for biopharmaceuticals designed to be efficiently absorbed by the intestinal mucosa or those whose therapeutic action lies in the gastrointestinal tract.

3. Summary of biopharmaceuticals expressed in microalgae

Several groups around the globe are reporting efforts to establish platforms to produce biopharmaceuticals in algal species. Figure 2 describes the classification and number of biopharmaceuticals expressed in microalgae thus far; with vaccine development as the most explored topic. A summary of the vaccines targeting human diseases is presented in Table 2. Some of the human vaccine candidates have been evaluated in animal models. Some of the most promising vaccine candidates against human diseases are: (i) a vaccine produced in *C. reinhardtii* against Peanut allergy, which was expressed in the chloroplast and able to protect mice against peanut-induced anaphylaxis upon intraperitoneal (i.p.) immunization [70]; (ii) a vaccine produced in *C. reinhardtii* against malaria, which was expressed in the chloroplast and able to reduce parasitemia in mice subjected to a scheme based on immunization by the i.p. and oral routes [32]; (iii) a vaccine against Human papillomavirus produced in *C. reinhardtii*, which was expressed in the chloroplast and able to provide anti-tumoral protection in mice upon subcutaneous (s.c.) immunization [71]; (iv) a vaccine against influenza produced in *Schizochytrium sp.*, which was based on nuclear expression and able to fully protect mice against a viral challenge upon parental immunization [35]; and (v) a vaccine based on a quimeric protein able to induce humoral responses against the Zika virus [59]. Thus far no clinical evaluations have been conducted for algae-made biopharmaceuticals.

A compilation of algae-made vaccines for veterinary use is presented in Table 3. In this case a vaccine produced in *Dunaliella salina* engineered at the nuclear level was designed against the White spot syndrome virus; it was able to significantly reduce the mortality of orally immunized crayfish [81]. The production of antibodies and immunotoxins is another important trend in the algae-made biopharmaceuticals field. This application is of high relevance since the treatment of cancer and other non-communicable diseases is involved. Table 4 summarizes the developments reported thus far. Among the promising findings of this application are: (i) an immunotoxin targeting CD22 carrying domains from the Exotoxin A (PE40) of *Pseudomonas aeruginosa*, which was expressed in the chloroplast of *C. reinhardtii* and proven to specifically bind and reduce the viability of B-cell lymphomas [82]; and (ii) a camelid antibody targeting the Botulinum neurotoxin, which was produced in the chloroplast of *C. reinhardtii* and detected in the gut of orally treated mice [83].

Another interesting case is the production of lytic enzymes, which are a viable alternative to the use of antibiotics that faces increasing difficulties due to the multidrug resistance developed by bacteria. Stoffels et al. [90] produced, in the chloroplast of *C. reinhardtii*, the endolysins Cpl-1 and Pal

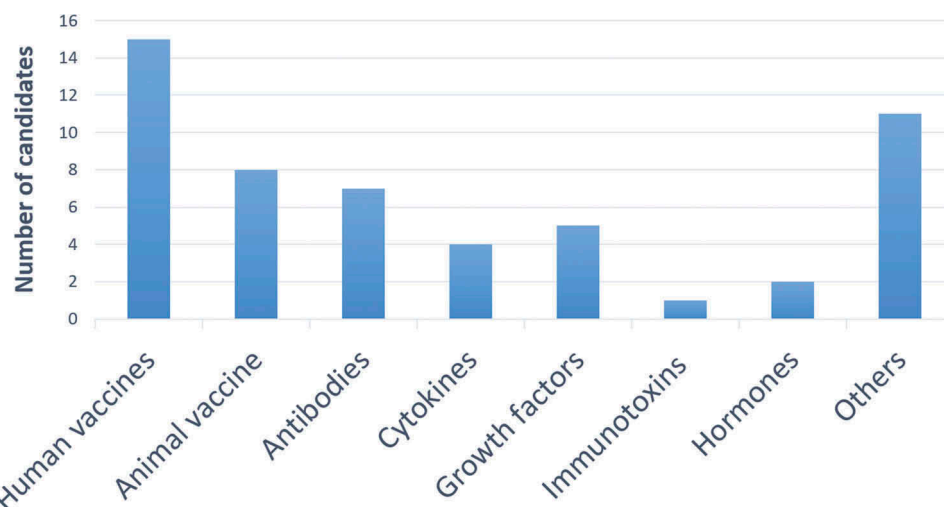


Figure 2. Current classification and number of biopharmaceuticals expressed in algae.

from *Streptococcus pneumoniae*. The algae-made endolysins showed antibacterial activity against *S. pneumoniae*, including clinical isolates with resistance against penicillin and cotrimoxazole. As for the production of cytokines and growth factors fewer reports are identified in the literature (Table 5). Two examples of functional growth factors manufactured in microalgae comprise the High mobility group protein B1 (produced in *C. reinhardtii* by chloroplast transformation); its functional activity was proven in a fibroblast chemotaxis assay by Rasala et al. [91] and the Human vascular endothelial growth factor (VEGF), produced in nuclearely-transformed *C. reinhardtii*, that promoted endothelial cell migration and blood vessel formation in mice [92].

Table 6 summarizes other biopharmaceuticals produced in microalgae thus far. Reports of special interest in this group of target molecules include an approach to express a double-stranded (ds) RNA targeting the Lethal shrimp yellow head virus (YHV) in *C. reinhardtii*, which was capable of increasing the survival of postlarval shrimps upon a challenge with YHV by 22% [95]. Kim et al. [96] achieved the expression of the Flounder growth hormone gene (fGH) in *Chlorella ellipsoidea*, which increased the growth rate of fish fed with this microalga by 25%. *Nannochloropsis oculata* has also been engineered to produce Lactoferricin (LfB), which provided protection to medaka fish against a challenge with *Vibrio parahaemolyticus* [97].

4. Expert opinion

In view of the promising results and the sustained research activity on this topic, the perspectives are attractive and the following paragraphs identify key challenges for exploiting algae as biofactories of biopharmaceuticals.

Although algae species have proven biosynthetic capacity of complex and functional proteins, the associated yields can still be further improved when compared to other emerging systems such as plants; in which viral vectors have allowed yields of up to 5 g per kg of biomass. Thus the optimization of protein yields should be implemented for a wide group of biopharmaceuticals. Applying such technologies augurs

significant progress during the upcoming years looking to increase the productivity of the algae-based platforms. In particular, the Algevir system is a promising approach offering high yields and inducible expression [58]. However, although this system allows for massive protein accumulation in a short period; no stocks are generated since they are based on transient expression and residual *Agrobacterium* makes the use of biomass for oral administration unviable. Therefore, an interesting prospect for the Algevir technology consists in developing stable transformants, which are subjected to long-term culture in which *Agrobacterium* is completely removed from the biomass for the straightforward production of oral formulations. The most attractive goal for this field is the development of oral treatments offering low cost (since purification and complex formulation is avoided) and simple administration (avoiding the need for trained personnel and sterilized devices) [71]. Pursuing these goals imply dealing with biopharmaceutical dilution and partial degradation in the gastrointestinal tract; as well as achieving efficient absorption of the biopharmaceutical to reach the target tissues, which can comprise the submucosa for immune response induction or even the systemic compartment and distant tissues. Although evidence on the delivery of intact antibodies in mice and the induction of immunoprotective responses by algae-made orally administered biopharmaceuticals has been reported [82,107,108]; there is a generally poor characterization of oral-based formulations, thus a great need for advancing in this field exists.

Another key aspect to be explored in detail is the glycosylation of biopharmaceuticals in algae-based systems since this could influence their functionality. For instance, differential glycosylation may be responsible for conferring immunogenic activity to the biopharmaceutical; thus favoring the production of blocking antibodies [109,110], increasing biopharmaceutical uptake by target cells [111], or enhancing the immunogenicity of the vaccine antigen [112]. Therefore, advances in the characterization of the glycosylation pathways in microalgae will be critical to define the convenience of producing biopharmaceuticals with specific glycan patterns; guaranteeing their efficacy, while preventing undesired

Table 2. Biopharmaceuticals produced in microalgae to fight human diseases.

Microalga name	Antigen expressed	Type of transformation	Route of administration/ Adjuvant	Intended application (disease or therapy)	Main outcomes	Reference
<i>Dunaliella salina</i>	Hepatitis B virus antigen (HBsAg)	Stable, Nuclear	Not presented	Hepatitis B	No mice immunization assays were performed. Yields obtained were up to 3.11 ng HBsAg/mg of soluble protein	[72]
<i>C. reinhardtii</i>	Human glutamic acid decarboxylase 65 (hGAD65)	Stable, Chloroplast	Not presented	Type I diabetes	Proliferation of spleen cells from NOD mice was demonstrated. Yields reached 0.25–0.3% of total soluble protein	[73]
<i>C. reinhardtii</i>	Antigen based on a fusion of the C-terminal domain from the Apical Major Antigen (AMA1), or Major Surface Protein (MSP1), with the granule bound starch synthase (GBSS)	Stable, Chloroplast	Oral/LTB i.p./Freund's	Malaria	Reduced parasitemia in mice, sera from immunized animals was active in <i>in vitro</i> assays against several plasmodial species	[74]
<i>C. reinhardtii</i>	Chimeric protein carrying the D2 fibronectin binding domain of <i>Staphylococcus aureus</i> and the cholera toxin B subunit	Stable, Chloroplast	Oral/none	<i>Staphylococcus aureus</i> infection	Induced specific mucosal and systemic immune responses in mice. Protected against a lethal challenge with <i>S. aureus</i> (80% of survival)	[107]
<i>C. reinhardtii</i>	<i>Plasmodium falciparum</i> surface proteins 25 (Pfs25) and 28 (Pfs28)	Stable, Chloroplast	i.p./Freund's	Malaria	Both antigens were immunogenic in mice and, following immunization with Pfs25, <i>in vitro</i> reacting antibodies were produced and blocked transmission	[75]
<i>C. reinhardtii</i>	Mutated E7 oncoprotein from the Human papillomavirus	Stable, Chloroplast	s.c./QuilA	Human Papillomavirus type 16	Produced specific anti-E7 IgG responses and tumor protection	[71]
<i>Schizochytrium sp.</i>	Recombinant hemagglutinin from A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) influenza virus	Stable, Nuclear	Parenteral/Alone or plus Addavax (squalene-based)	Influenza	Fully protected mice from a lethal viral challenge	[35]
<i>C. reinhardtii</i>	A fusion protein containing luciferase and the human butyrylcholinesterase (huBuChE)	Stable, nuclear	Not presented	Pesticide poisonings	Yields reached up to 0.4% of total soluble protein. The fusion protein was enzymatically inactive	[76]
<i>C. reinhardtii</i>	Chimeric protein of the nucleocapsid antigen from Hepatitis B virus (HBcAg) fused to angiotensin II	Stable, Nuclear	Not presented	Hypertension	No immunization assays were performed. Yields reached 0.05% of total soluble protein	[77]
<i>C. reinhardtii</i>	p24 HIV antigen	Stable, Nuclear	Not presented	HIV	Yields reached 0.25% of the total cellular protein	[49]
<i>C. reinhardtii</i>	Chimeric protein carrying the p210 epitope from human ApoB100 and the cholera toxin B subunit (CTB:p210)	Stable, Chloroplast	Oral/none	Atherosclerosis	Elicited anti-p210 serum antibodies in mice and the response persisted for at least 80 days	[78]
<i>C. reinhardtii</i>	Ara h 1 and Ara h 2 (CrAra h 1 and CrAra h 2); and a truncated version of CrAra h 1 (amino acids 171–586)	Stable, Chloroplast	i.p./none	Peanut allergy	Ara h 1-core domain protected from peanut-induced anaphylaxis in mice	[70]
<i>C. reinhardtii</i>	HIV antigen P24	Stable, nuclear	Not presented	HIV-1	The combination of a codon optimized synthetic gene and the expression strain led to accumulation of up to 0.25% of total cellular protein with only one copy of the gene in the genome	[49]
<i>C. reinhardtii</i>	The major birch pollen allergen, Bet v 1	Stable, chloroplast	Not presented	Allergen immunotherapy	Yields ranged 0.01–0.04% of total soluble protein. The microalgae-made Bet v 1 showed similar antibody binding profiles with murine monoclonal antibodies and with human IgE	[79]
<i>Schizochytrium sp.</i>	GP1 from the Zaire Ebola virus and the bacterial toxin B subunit of the heat-labile from <i>E. coli</i> (LTB)	Transient	Not presented	Ebola virus	Yields reached up to 1.25 mg/g FW for GP1 and 0.12 mg/g FW for LTB	[58]
<i>C. reinhardtii</i>	Fusion protein carrying a candidate for pre-erythrocytic and transmission-blocking vaccine; fused to human interleukin-2 (IL-2) as adjuvant	Stable, chloroplast	Not presented	Malaria	Yields reached up to 1.5% of total soluble protein and the protein was properly folded	[80]
<i>Schizochytrium sp.</i>	Chimeric protein carrying an epitope from the receptor of advanced glycation end products (RAGE) fused to the B subunit of <i>E. coli</i> heat labile enterotoxin (LTB), LTB:RAGE	Transient	Not presented	Alzheimer's disease (AD)	Yields reached up to 380 µg/g FW. The LTB:RAGE antigen showed antigenic activity	[25]
<i>Schizochytrium sp.</i>	Chimeric protein carrying 3 epitopes from the envelope protein of ZIKA virus fused to cholera toxin B subunit	Transient	Oral/LTB s.c./Freund's	ZIKA virus	Produced significant humoral responses in orally immunized mice at a higher magnitude to those induced upon s.c. immunization	[59]

Table 3. Biopharmaceuticals produced in microalgae to fight animal diseases.

Microalga name	Antigen expressed	Type of transformation	Route of administration/ Adjuvant	Intended application (disease or therapy)	Main outcomes	Reference
<i>C. reinhardtii</i>	VP1 protein fused to the cholera toxin B subunit (CTB)	Stable, chloroplast	Not presented	Foot-and-mouth disease virus (FMDV)	Yields reached up to 3% of total soluble protein, ELISA assays confirmed the antigenicity	[84]
<i>C. reinhardtii</i>	Structural protein E2	Stable, chloroplast	Oral/none	Classical swine fever virus (CSFV)	Yields reached 1.5–2% of total soluble protein. Produced humoral responses in s.c. immunized mice	[85]
<i>C. reinhardtii</i>	Type 2 antigen	Stable, chloroplast	Not presented	Porcine circovirus-associated disease (PCVAD)	Patent under development	[86]
<i>Dunaliella salina</i>	VP28 protein	Stable, nuclear	Oral/none	White spot syndrome virus (WSSV)	Reduced mortality by 40% in orally immunized crayfish	[81]
<i>Thalassiosira pseudonana</i>	IbpA DR2 antigen	Stable, nuclear	s.c./Quill A	<i>Histophilus somni</i> Bovine respiratory disease	Produced modest humoral responses in mice	[87]

reactions (immunogenicity). It should be noted that even in mammalian cell lines glycosylation must be optimized since, when compared to human cells, some differences in glycosylation patterns will occur [113].

The vast majority of the reports dealing with biopharmaceuticals produced in microalgae are described on a laboratory scale (flask); thus to enhance the developmental potential of this technology there is an urgent need to scale-up these models to bioreactors. Among the key aspects to be studied are media optimization and improvements in photobioreactor design. Therefore, bioprocessing implementation and optimization under good manufacturing practices (GMP) is a pending goal. Although research on algae for biofuel production has been largely performed, the standards for biopharmaceuticals production are different from those for biofuel or food production. Since bioreactors are generally closed systems, these devices are the most appropriate for algae-based biopharmaceuticals production. In this regard, bioreactor design and operation are critical aspects in the production process. The cultivation of algae in bioreactors offers several advantages that include the possibility of full containment (to enhance biosafety) and the proper control of growth parameters to optimize biomass production and productivity. In this way the regulatory approval is favored. However, new cultivation approaches based on Phi assimilation will open alternatives for biopharmaceuticals production. The current advances in cultivation and harvesting achieved by the industrial algal production for commercial products will greatly favor the implementation of systems for biopharmaceuticals production. Since algae constitute a vast and diverse group of species; the potential of improving the technology for producing biopharmaceutical in these hosts is with no doubt great and the exploration of more species for this purpose deserves attention in the biotechnology field. For instance, extremophilic algal species may provide robust production platforms that remain unexplored.

Following the successful proof-of-concept assessments; the goal of achieving commercialization of algae-made biopharmaceuticals in the benefit of population, especially in the developing world, implies several subsequent steps in which collaborations between various groups are required. Most of the ongoing research in this field is performed in academic institutions, thus the academia-industry relationship will be critical to attract investors and accelerate intellectual property protection. Patents are essential incentives to foster innovation; in particular for the case of biopharmaceuticals since these require lengthy, costly, and risky processes to perform research and development. This importance remains despite the many changes in the market and patent landscape [114]. Another critical goal consists in completing the preclinical evaluation by conducting safety and toxicological evaluations. Moreover there is a great need to proceed with clinical trials, which have not been reported thus far for algae-made biopharmaceuticals. Again, these goals will critically depend on establishing a partnership with the industry and government agencies since high investments are required to address them. Importantly the experience gained in the clinical evaluation of biopharmaceuticals made in organisms closely related to algae, e.g. plants, will be useful; especially in terms of defining the regulatory framework [115–117].

Table 4. Antibodies and immunotoxins produced in microalgae.

Microalga name	Antibody or immunotoxin expressed	Type of transformation	Immunization assay: Route of administration/ Adjuvant	Intended application (disease or therapy)	Main outcome	Reference
<i>C. reinhardtii</i>	Large single-chain antibody against Herpes simplex virus glycoprotein D	Stable, Chloroplast	Not presented	Herpes simplex virus	Expression reached up to 1% of total soluble protein. Specific affinity of the antibody to the herpes virus proteins was demonstrated by ELISA	[10]
<i>C. reinhardtii</i>	Human IgG1 monoclonal antibody 83K7 C	Stable, Chloroplast	Not presented	PA83 Anthrax antigen	The recombinant antibody affinity was similar to the antibody expressed in mammalian cells	[24]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Human monoclonal IgG1 antibody CL4mAb	Stable, Nuclear	Not presented	Hepatitis B	The human monoclonal IgG1 antibody against Hepatitis B reached expression levels of 9% of total soluble protein	[88]
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	Human monoclonal IgG antibody CL4mAb	Stable, Nuclear	Not presented	Hepatitis B	Efficient protein expression and secretion of the recombinant IgG antibody. Yields reached 2.5 µg/mL of medium culture	[32]
<i>C. reinhardtii</i>	Immunotoxin (αCD22PE40) comprising the domains II and III of Exotoxin A (PE40) from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> and the scFv targeting CD22	Stable, Chloroplast	Not presented	Cancer	The expressed immunotoxins were capable of binding and reducing the viability of B-cell lymphomas	[83]
<i>C. reinhardtii</i>	Camelid heavy chain-only antibodies (VHH)	Stable, Chloroplast	Oral/none	Botulinum neurotoxin	The algae-made antibodies neutralized the botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A). After mice immunization, neutralizing antibodies resisted the gastrointestinal tract	[82]
<i>P. tricornutum</i>	Anti-hepatitis B antibody	Stable, nuclear	In vitro assays	Hepatitis B	The recombinant antibody binds to Fcγ receptors (FcγRI with low affinity and FcγRIIIa with high affinity)	[89]

Table 5. Cytokines and growth factors produced in microalgae.

Microalga name	Cytokines or growth factors expressed	Type of transformation	Animal assays:	Intended application (disease or therapy)	Patent under development	Main outcome	Reference
<i>Dunaliella Salina</i>	Tumor necrosis factor α (TNF- α)	Stable, chloroplast	Not presented	Different targets	Patent under development		[93]
<i>C. reinhardtii</i>	Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	Stable, chloroplast	Not presented	Tumor cells and virus-infected cells	Expression was demonstrated by Western blot and yields reached up to 0.67% of total soluble protein		[94]
<i>C. reinhardtii</i>	Human interferon β 1 (IFN- β 1)	Stable, chloroplast	Not presented	Multiple sclerosis	Low expression of the recombinant protein		[91]
<i>C. reinhardtii</i>	Human vascular endothelial growth factor (VEGF)	Stable, chloroplast	Not presented	Pulmonary emphysema, erectile dysfunction, or depression	Expression in algae showed similar yields to those observed in <i>E. coli</i> , 2.5% of total soluble protein		[91]
<i>C. reinhardtii</i>	High mobility group protein B1 (HMGB1)	Stable, chloroplast	Not presented	Endothelial cell activation, stromagenesis, recruitment and activation of innate immune cells, and dendritic cell maturation	Recombinant protein demonstrated to be functional in a Fibroblast chemotaxis assay		[91]
<i>C. reinhardtii</i>	Human vascular endothelial growth factor (VEGF)	Stable, nuclear	<i>In vivo</i> experiments on female Skh1 hairless mice	Therapy for regeneration	Recombinant VEGF promoted endothelial cell migration and blood vessel formation after one week, however it did not significantly increase the rate of vascularization over the wound		[92]

Table 6. Other biopharmaceuticals produced in microalgae.

Microalga name	Expressed protein	Type of transformation	Bioactivity assays performed	Intended application (disease or therapy)	Main outcome	Reference
<i>Chlorella vulgaris</i> strain C-27 and <i>Chlorella sorokiniana</i> ATCC-22521	Human growth hormone (hGH)	Stable, protoplasts	Not presented	hGH deficiency	The recombinant protein was secreted to the culture medium with average yields of 200–600 ng/mL	[98]
<i>Chlorella ellipsoidea</i> (nrm -4) strain	The rabbit neutrophil peptide-1 (NPI)	Stable, nuclear	<i>In vitro</i> bioactivity assays against <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> , and <i>Fusarium oxysporum</i>	Antibacterial and antifungal activity in aquaculture	Yields reached up to 11.42 mg/L and the peptide functionality against <i>E. coli</i> showed to be strong at only 5 µg/mL	[99]
<i>Chlorella ellipsoidea</i>	Flounder growth hormone gene (fGH)	Stable, protoplasts	Flounder fry were fed with the transformed <i>C. ellipsoidea</i>	Growth hormone used in aquaculture	Fish fed with the transformed algae exhibited 25% increase in growth rate after a 30-day treatment	[96]
<i>C. reinhardtii</i>	Erythropoietin (Epo)	Stable, nuclear	Not presented	Anemia	Very low expression of Epo (100 µg/L in the supernatant or 0.03% of the dry weight)	[100]
<i>Nannochloropsis oculata</i>	Lactoferricin (LfB)	Stable, nuclear	Medaka fish were fed with the transformed <i>N. oculata</i>	Infectious diseases in aquaculture	Enhanced survival rate upon <i>Vibrio parahaemolyticus</i> challenge	[97]
<i>C. reinhardtii</i>	The fourteenth human fibronectin type III domain (14FN3) and the tenth fibronectin-type III domain (10FN3)	Stable, chloroplast	Not presented	Antibody mimic in several applications.	Yields were up to 3% TSP for 14FN3, whereas 10FN3 was not expressed at significant levels	[91]
<i>C. reinhardtii</i>	Erythropoietin (Epo)	Stable, chloroplast	Not presented	Anemia	Epo was not expressed at significant levels	[91]
<i>C. reinhardtii</i>	VapA and AcrV antigens from the fish bacterial pathogen <i>Aeromonas salmonicida</i>	Stable, chloroplast	Not presented	Infectious diseases in aquaculture	Best yields were obtained using a mutant <i>C. reinhardtii</i> strain (0.3% TSP for VapA and 0.8% TSP for AcrV)	[101]
<i>Dunaliella salina</i>	Soybean Kunitz trypsin inhibitor (SKTI)	Stable, nuclear	Not presented	Anti-inflammatory and anticarcinogenic agent	Yields reached up to 0.68% TSP	[102]
<i>C. reinhardtii</i>	Double-stranded (ds)RNA targeting lethal shrimp yellow head virus (YHV)	Stable, nuclear	Feeding of postlarval shrimps	Antiviral against shrimp viruses	Increased shrimp survival by 22% upon a challenge with YHV	[95]
<i>C. reinhardtii</i>	Human growth hormone	Stable, chloroplast	<i>In vitro</i> assays on the Nb2-11 rat lymphoma cell line	Human growth hormone deficiency, Turner syndrome, etc.	Induced an 8-fold increase in cell number	[103]
<i>C. reinhardtii</i>	Bacterial endoglycanase (CelK1, Glycohydrolase, family 5)	Stable, chloroplast	Not presented	Potential applications in agro-industrial processes such as bioethanol and biogas production	Very low protein expression; 0.003% TSP, specific activity was not determined	[104]
<i>C. reinhardtii</i>	3x Myticitin-A peptide (comprising 3 tandem repeats of the peptide)	Stable, nuclear	<i>In vitro</i> bioactivity assays against <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> O157, and <i>Salmonella enteritidis</i>	Antimicrobial peptide against fungi, viruses, parasites, and bacteria	Inhibited the growth of gram-negative bacteria with moderate potency (<i>E. coli</i> MIC = 60 µg/mL, and <i>Salmonella enteritidis</i> MIC = 80 µg/mL), whereas good potency was achieved for the gram-positive bacterium <i>L. monocytogenes</i> (MIC: 80 µg/ml)	[105]
<i>C. reinhardtii</i>	Endolysins Cpl-1 and Pal from <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Stable, chloroplast	<i>In vitro</i> activity assays using <i>S. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , and <i>S. pyogenes</i> cultures	Antibacterial agent	Yields reached up to 1% TSP. The crude extracts and purified proteins demonstrated antibacterial activity against <i>S. pneumoniae</i> , including clinical isolates with resistance against penicillin and co-trimoxazole	[90]
<i>C. reinhardtii</i>	Human epidermal growth factor (hEGF)	Stable, nuclear	Not presented	Human epidermal growth factor deficiency	Yields reached up to 0.25% TSP	[106]

Abbreviations: MIC, minimum inhibition concentration; TSP, total soluble protein; FW, fresh weight.

Table 7. Compilation of companies adopting algae-based platforms for biopharmaceuticals production.

Name	Link	Description
TransAlgae	www.transalgae.com	Israeli company that develops algae-based platforms for oral delivery of drugs for animal health and crop protection applications
MicroSynbiotix	www.microsynbiotix.com	Irish company that develops microalgae-based oral vaccines for aquaculture
Axitan	www.axitan.com	British company that develops microalgae-based edible vaccines and peptides for the animal health industry
Mara Renewables Corporation	www.maracorp.ca	Atlantic Canadian producer of algae-based bioproducts
Triton	www.tritonai.com	Develops algae-based products as nutritional supplements and human milk proteins such as Osteopontin
BioGreen Synergy	www.biogreensynergy.com	A US company that develops products for use in aquaculture and marine biotechnology, as well as pharmaceuticals.

Since the biosimilars (generic substitutes) production era has begun, there are great possibilities to expand the production of known therapeutic molecules in algae [118]. The strong background on the efficacy and wide clinical experience with innovator products will make the development of biosimilars a smoother path [119]. However due to the high molecular complexity of biopharmaceuticals, the process of development and approval of biosimilars is complicated. The main challenge is that variations in the biosimilar could be generated since no information on the originator's processes is available. For this reason, regulatory requirements are needed to ensure biosimilarity, comparability, and interchangeability with respect to efficacy and safety [120]. Both the EU and the US have prepared guidance documents for biosimilars that will result in biotherapeutics that are as safe and efficacious as the innovator product [121]. Generating and complying with a regulatory framework for algae-made biopharmaceuticals (biosimilars or innovator products) will be a key objective to accomplish approval by the FDA, the EU, or local regulatory agencies.

The challenge for the field is to achieve the adoption of the algae-based platforms for biopharmaceuticals production by the industry; developing regulatory framework and obtaining approvals. Although there are only a limited number of companies in the algae-made biopharmaceuticals field, an increase has been observed over the last five years. Companies working on developments based on recombinant algae-based products to promote human or animal health are presented in Table 7. The use of plants for the production of biopharmaceuticals constitutes a key reference for this field since during the development of such technology similar challenges were faced. After almost four decades of research, efficient expression systems for plants with yields up to 5 g/kg fresh weight biomass under GMP-compliant production have been developed [122]. Recently modeling the manufacturing economics for some plant-made biopharmaceuticals has been reported [12]. Thus far only one plant-made biopharmaceutical has been approved for use in humans and some others are in clinical trials [123]. Achieving the goal of winning regulatory endorsement for algae-made will be facilitated with no doubt by the experience derived from plant-made biopharmaceuticals.

In conclusion the use of algae for producing and even delivering biopharmaceuticals offers an alternative to address prohibitively expensive purification, cold storage/transportation, and short shelf life of the current biopharmaceuticals in the benefit of public health; especially in low-income countries.

Funding

This paper is funded by a grant to S Rosales Mendoza: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología [CB-256063].

Declaration of Interest

The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

Reviewer Disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial relationships or otherwise to disclose.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (***) to readers.

1. Finckh A, Neto D, Iannone F, et al. The impact of patient heterogeneity and socioeconomic factors on abatacept retention in rheumatoid arthritis across nine European countries. *RMD Open*. 2015;1(1):e000040.
 2. Rader RA. (Re) defining biopharmaceutical. *Nat Biotechnol*. 2008;26(7):743–751.
 3. Schellekens H. How similar 'biosimilars' need to be? *Nat Biotechnol*. 2004;22(11):1357–1359.
 4. Dhara VG, Naik HM, Modjeska N, et al. Recombinant antibody production in CHO and NS0 Cells: differences and similarities. *BioDrugs*. 2018;32(6):571–584.
 5. Kis Z, Shattuck R, Shah N, et al. Emerging technologies for low-cost, rapid vaccine manufacture. *Biotechnol J*. 2019;14(1):1800376.
 6. Ritacco FV, Wu Y, Khetan A. Cell culture media for recombinant protein expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells: history, key components, and optimization strategies. *Biotechnol Prog*. 2018;34(6):1407–1426.
 7. Sanchez-Garcia L, Martin L, Mangués R, et al. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: a 2015 update. *Microb Cell Fact*. 2016;15:33.
 8. Sivakumar G, editor. New insights into cell culture technology. Rijeka, Croatia: InTech; 2017. p. 43–97.
 9. Yan N, Fan C, Chen Y, et al. The potential for microalgae as bioreactors to produce pharmaceuticals. *Int J Mol Sci*. 2016;17(6):962.
 10. Mayfield SP, Franklin SE, Lerner RA. Expression and assembly of a fully active antibody in algae. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(2):438–442.
- A pioneering work on the production of functional antibodies in microalgae.

11. Gimpel JA, Henríquez V, Mayfield SP. In metabolic engineering of eukaryotic microalgae: potential and challenges come with great diversity. *Front Microbiol.* 2015a;6:1376.
12. Alam A, Jiang L, Kittleson GA, et al. Technoeconomic modeling of plant-based Griffithsin manufacturing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:102.
13. Twyman RM, Stoger E, Schillberg S, et al. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends Biotechnol.* 2003;21(12):570–578.
14. Draaisma RB, Wijffels RH, Slegers PM, et al. Food commodities from microalgae. *Curr Opin Biotechnol.* 2013;24(2):169–177.
15. Rasala BA, Mayfield SP. Photosynthetic biomanufacturing in green algae; production of recombinant proteins for industrial, nutritional, and medical uses. *Photosynth Res.* 2015;123:227–239.
16. Erdene-Ochir E, Shin BK, Kwon B, et al. Identification and characterisation of the novel endogenous promoter HASP1 and its signal peptide from *Phaeodactylum tricornutum*. *Sci Rep.* 2019 July 9;9(1):9941.
17. Zhang Z, He P, Zhou Y, et al. Anti-HBV effect of interferon-thymosin α 1 recombinant proteins in transgenic *Dunaliella salina* in vitro and in vivo. *Exp Ther Med.* 2018 Aug;16(2):517–522.
18. Niu YF, Zhang MH, Xie WH, et al. A new inducible expression system in a transformed green alga, *Chlorella vulgaris*. *Genet Mol Res.* 2011 Oct 21;10(4):3427–3434.
19. Ramos-Vega A, Rosales-Mendoza S, Bañuelos-Hernández B, et al. Prospects on the use of *Schizochytrium sp.* to develop oral vaccines. *Front Microbiol.* 2018 Oct;25(9):2506.
20. Schroda M. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth Res.* 2004;82(3):221–240.
21. Breiman A, Fawcett TW, Ghirardi ML, et al. Plant organelles contain distinct peptidylprolyl cis, trans-isomerases. *J Biol Chem.* 1992;267(30):21293–21296.
22. Anyaogu DC, Mortensen UH. Manipulating the glycosylation pathway in bacterial and lower eukaryotes for production of therapeutic proteins. *Curr Opin Biotechnol.* 2015;36:122–128.
23. Mócsai R, Figl R, Troschl C, et al. N-glycans of the microalga *Chlorella vulgaris* are of the oligomannosidic type but highly methylated. *Sci Rep.* 2019 Jan 23;9(1):331.
24. Tran M, Zhou B, Pettersson PL, et al. Synthesis and assembly of a full-length human monoclonal antibody in algal chloroplasts. *Biotechnol Bioeng.* 2009;104(4):663–673.
25. Ortega-Berlanga B, Bañuelos-Hernández B, Rosales-Mendoza S. Efficient expression of an Alzheimer's disease vaccine candidate in the microalga *Schizochytrium sp.* using the Algevir system. *Mol Biotechnol.* 2018;60(5):362–368.
26. Kwon KC, Lamb A, Fox D, et al. An evaluation of microalgae as a recombinant protein oral delivery platform for fish using green fluorescent protein (GFP). *Fish Shellfish Immunol.* 2019 Apr;87:414–420. Epub 2019 Jan 28.
27. Chen Q. Expression and Purification of Pharmaceutical Proteins in Plants. *Biol Eng.* 2008;1(4):291–321.
28. McNulty MJ, Gleba Y, Tusé D, et al. Techno-economic analysis of a plant-based platform for manufacturing antimicrobial proteins for food safety. *Biotechnol Prog.* 2020;36(1):1–15:e2896.
29. Vazquez-Villegas P, Torres-Acosta MA, Garcia-Echauri SA, et al. Genetic manipulation of microalgae for the production of bioproducts. *Front Biosci (Elite Ed).* 2018;10:254–275.
30. Rosales-Mendoza S. Future directions for the development of *Chlamydomonas*-based vaccines. *Expert Rev Vaccines.* 2013;12(9):1011–1019.
31. Lauenstein KJ, Huber I, Wichmann J, et al. Investigating the dynamics of recombinant protein secretion from a microalgal host. *J Biotechnol.* 2015;215:62–71.
32. Hempel F, Maier UG. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microb Cell Fact.* 2012;11:126.
33. Rasala BA, Lee PA, Shen Z, et al. Robust expression and secretion of Xylanase1 in *Chlamydomonas reinhardtii* by fusion to a selection gene and processing with the FMDV 2A peptide. *PLoS One.* 2012;7:e43349.
 - **Describes the use of genetic fusions to enhance protein yields.**
34. Lauenstein KJ, Vanderveer TL, Berger H, et al. Ice recrystallization inhibition mediated by a nuclear-expressed and -secreted recombinant ice-binding protein in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97(22):9763–9772.
35. Bayne AC, Boltz D, Owen C, et al. Vaccination against influenza with recombinant hemagglutinin expressed by *Schizochytrium sp.* confers protective immunity. *PLoS One.* 8(4): e61790. 2013.
 - **This report shows the potential of *Schizochytrium sp.* to produce vaccines.**
36. Dong B, Hu H, Li Z, et al. A novel bicistronic expression system composed of the intraflagellar transport protein gene *ift25* and FMDV 2A sequence directs robust nuclear gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017;101:4227–4245.
37. Shao N, Bock R. A codon-optimized luciferase from *Gussia princeps* facilitates the in vivo monitoring of gene expression in the model alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet.* 2008;53:381–388.
38. Molino JVD, de Carvalho JCM, Mayfield SP. Comparison of secretory signal peptides for heterologous protein expression in microalgae: expanding the secretion portfolio for *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One.* 2018 Feb 6;13(2):e0192433.
39. Kilian O 1, Benemann CS, Niyogi KK, et al. High-efficiency homologous recombination in the oil-producing alga *Nannochloropsis sp.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 27;108(52):21265–21269. Epub 2011 Nov 28.
40. Levitan A, Trebitsh T, Kiss V, et al. Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(17):6225–6230.
41. Tran M, Henry RE, Siefker D, et al. Production of anti-cancer immunotoxins in algae: ribosome inactivating proteins as fusion partners. *Biotechnol Bioeng.* 2013b;110(11):2826–2835.
42. Doron L, Segal N, Shapira M. Transgene expression in microalgae—from tools to applications. *Front Plant Sci.* 2016;7:505.
43. Bock R, Warzecha H. Solar-powered factories for new vaccines and antibiotics. *Trends Biotechnol.* 2010;28(5):246–252.
44. Murakami M, Kiuchi T, Nishihara M, et al. Chemical synthesis of erythropoietin glycoforms for insights into the relationship between glycosylation pattern and bioactivity. *Sci Adv.* 2016 Jan 15;2(1):1500678.
45. Wada R, Matsui M, Kawasaki N. Influence of N-glycosylation on effector functions and thermal stability of glycoengineered IgG1 monoclonal antibody with homogeneous glycoforms. *mAbs.* 2019;11(2):350–372.
46. Gimpel JA, Hyun JS, Schoepp NG, et al. Production of recombinant proteins in microalgae at pilot greenhouse scale. *Biotechnol Bioeng.* 112(2): 339–345. 2015b.
 - **Presents one of the most productive systems for producing biopharmaceuticals in microalgae.**
47. Dyo YM, Purton S. The algal chloroplast as a synthetic biology platform for production of therapeutic proteins. *Microbiology.* 2018;164(2):113–121.
 - **An excellent review covering transgene expression approaches in detail.**
48. Rasala BA, Chao SS, Pier M, et al. Enhanced genetic tools for engineering multigene traits into green algae. *PLoS One.* 2014;9(4):e94028.
49. Barahimipour R, Neupert J, Bock R. Efficient expression of nuclear transgenes in the green alga *Chlamydomonas*: synthesis of an HIV antigen and development of a new selectable marker. *Plant Mol Biol.* 2016;90:403–418.
50. Fuhrmann M, Oertel W, Hegemann P. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 1999;19:353–361.
51. Lee S, Lee YJ, Choi S, et al. Development of an alcohol-inducible gene expression system for recombinant protein expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Phycol.* 2018;30(4):2297–2304.
52. Cerutti H, Casas-Mollano JA. On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet.* 2006;50(2):81–99.
53. Kurniasih SD, Yamasaki T, Kong F, et al. UV-mediated *Chlamydomonas* mutants with enhanced nuclear transgene expression by disruption of

- DNA methylation-dependent and independent silencing systems. *Plant Mol Biol.* **2016**;92(6):629–641.
54. Neupert J, Karcher D, Bock R. Generation of *Chlamydomonas* strains that efficiently express nuclear transgenes. *Plant J.* **2009**;57(6):1140–1150.
- **Describes microalgae mutants with enhanced transgene expression.**
55. Baier T, Wichmann J, Kruse O, et al. Intron-containing algal transgenes mediate efficient recombinant gene expression in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Res.* **2018b**;46:136909–136919.
56. Ramos-Martinez EM, Fimognari L, Sakuragi Y. High-yield secretion of recombinant proteins from the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotech J.* **2017**;15(9):1214–1224.
57. Gomord V, Fitchette AC, Menu-Bouaouiche L, et al. Plant-specific glycosylation patterns in the context of therapeutic protein production. *Plant Biotechnol J.* **2010**;8(5):564–587.
58. Bañuelos-Hernández B, Monreal-Escalante E, González-Ortega O. Algevir: an expression system for microalgae based on viral vectors. *Front Microbiol.* **2017**;30(8):1100.
- **A report on an innovative expression system for microalgae.**
59. Márquez-Escobar VA, Bañuelos-Hernández B, Rosales-Mendoza S. Expression of a Zika virus antigen in microalgae: towards mucosal vaccine development. *J Biotechnol.* **2018**;282:86–91.
60. Patel VK, Soni N, Prasad V, et al. CRISPR–Cas9 system for genome engineering of photosynthetic microalgae. *Mol Biotechnol.* **2019**;61:541–561.
61. Encarnação T, Pais AA, Campos MG, et al. Cyanobacteria and microalgae: a renewable source of bioactive compounds and other chemicals. *Sci Prog.* **2015**;98(Pt 2):145–168.
62. Carrera-Pacheco SE, Hankamer B, Oey M. Optimising light conditions increases recombinant protein production in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Algal Res.* **2018**;32:329–340.
63. Lizzul AM, Lekuona-Amundarain A, Purton S, et al. Characterization of *Chlorella sorokiniana*, UTEX 1230. *Biology (Basel).* **2018**;7(2):pii: E25.
64. Loera-Quezada MM, Leyva-González MA, Velázquez-Juárez G, et al. A novel genetic engineering platform for the effective management of biological contaminants for the production of microalgae. *Plant Biotechnol J.* **2016**;14(10):2066–2076.
65. Sandoval-Vargas JM, Macedo-Osorio KS, Durán-Figueroa NV, et al. Chloroplast engineering of *Chlamydomonas reinhardtii* to use phosphate as phosphorus source. *Algal Res.* **2018**;33:291–297.
66. Poehlein A, Daniel R, Schink B, et al. Life based on phosphite: a genome-guided analysis of *Desulfotignum phosphitoxidans*. *BMC Genomics.* **2013**;14(1):753.
67. Ravi A, Guo S, Rasala B, et al., Separation options for phosphorylated osteopontin from transgenic microalgae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int J Mol Sci.* **19**(2): pii: E585. **2018**.
- **A pioneering report on the downstream processing for algae-made biopharmaceuticals.**
68. Lomonosoff GP, D'Aoust MA. Plant-produced biopharmaceuticals: a case of technical developments driving clinical deployment. *Science.* **2016**;353(6305):1237–1240.
69. Su J, Zhu L, Sherman A, et al. Low cost industrial production of coagulation factor IX bioencapsulated in lettuce cells for oral tolerance induction in hemophilia B. *Biomaterials.* **2015**;70:84–93.
70. Gregory JA, Shepley-McTaggart A, Umpierrez M, et al., Immunotherapy using algal-produced Ara h 1 core domain suppresses peanut allergy in mice. *Plant Biotechnol J.* **14**(7): 1541–1550. **2016**.
- **An example on the use of algae-made antigens to treat allergies.**
71. Demurtas OC, Massa S, Ferrante P. A *Chlamydomonas* - derived Human Papillomavirus 16 E7 vaccine induces specific tumor protection. *PLoS One.* **2013**;8(4):e61473.
- **A case of a functional vaccine produced in microalgae.**
72. Geng D, Wang Y, Wang P, et al. Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (*Chlorophyta*). *J Appl Phycol.* **2003**;15:451–456.
73. Wang XF, Brandsma M, Tremblay R, et al. A novel expression platform for the production of diabetes-associated autoantigen human glutamic acid decarboxylase (hGAD65). *BMC Biotechnol.* **2008**;8:87.
74. Dauvillée D, Delhaye S, Gruyer S, et al. Engineering the chloroplast targeted malarial vaccine antigens in *Chlamydomonas* starch granules. *PLoS One.* **2010**;5(12):e15424.
75. Gregory JA, Li F, Tomosada LM, et al. Algae produced Pfs25 elicits antibodies that inhibit malaria transmission. *PLoS One.* **2012**;7(5): e37179.
76. Kumar A, Falcao VR, Sayre RT. Evaluating nuclear transgene expression systems in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res.* **2013**;2(4):321–332.
77. Soria-Guerra RE, Ramirez-Alonso JI, Ibañez-Salazar A, et al. Expression of an HBcAg-based antigen carrying angiotensin II in *Chlamydomonas reinhardtii* as a candidate hypertension vaccine. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* **2014**;116:133–139.
78. Beltrán-López JI, Romero-Maldonado A, Monreal-Escalante E, et al. *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts express an orally immunogenic protein targeting the p210 epitope implicated in atherosclerosis immunotherapies. *Plant Cell Rep.* **2016**;35(5):1133–1141.
79. Hirschl S, Ralsler C, Asam C, et al. Expression and characterization of functional recombinant Bet v 1.0101 in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Int Arch Allergy Immunol.* **2017**;173(1):44–50.
80. Shamriz S, Ofoghi H. Engineering the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* to express the recombinant PfcelTOS-II2 antigen-adjuvant fusion protein. *J Biotechnol.* **2018**;266:111–117.
81. Feng S, Feng W, Zhao L, et al. Preparation of transgenic *Dunaliella salina* for immunization against white spot syndrome virus in crayfish. *Arch Virol.* **2014**;159:519–525.
82. Tran M, Van C, Barrera DJ, et al., Production of unique immunotoxin cancer therapeutics in algal chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* **110**(1): E15–E22. **2013**.
- **An example of a functional immunotoxin produced in microalgae.**
83. Barrera DJ, Rosenberg JN, Chiu JG, et al., Algal chloroplast produced camelid VH H antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnol J.* **13**(1): 117–124. **2015**.
- **A report on the production of a functional camelid antibody in microalgae.**
84. Sun M, Qian K, Su N, et al. Foot-and-mouth disease virus VP1 protein fused with cholera toxin B subunit expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Biotechnol Lett.* **2003**;25:1087–1092.
85. He DM, Qian KX, Shen GF, et al. Recombination and expression of classical swine fever virus (CSFV) structural protein E2 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **2007**;55:26–30.
86. Yang Z, Wang J, Cheng X, et al. Making porcine circovirus vaccine to prevent/treat porcine circovirus infection involves coding porcine circovirus type 2 antigen gene in *Chlamydomonas* chloroplasts, constructing chloroplasts in expression box; selecting antigen; screening. Patent CN103007269-A. **2013**.
87. Davis A, Crum LT, Corbeil LB, et al. Expression of *Histophilus somni* IbpA DR2 protective antigen in the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2017**;101(13):5313–5324.
88. Hempel F, Lau J, Klingl A, et al. Algae as protein factories: expression of a human antibody and the respective antigen in the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS One.* **2011**;6(12):e28424.
89. Vanier G, Stelter S, Vanier J, et al. Alga-made anti-Hepatitis B antibody binds to human fcγ receptors. *Biotechnol J.* **2018**;13(4):e1700496.
90. Stoffels L, Taunt HN, Charalambous B, et al. Synthesis of bacteriophage lytic proteins against *Streptococcus pneumoniae* in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.* **2017**;15(9):1130–1140.
91. Rasala BA, Muto M, Lee PA, et al. Production of therapeutic proteins in algae, analysis of expression of seven human proteins in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Biotechnol J.* **2010**;8(6):719–733.
92. Chávez MN, Schenck TL, Hopfner U, et al. Towards autotrophic tissue engineering: photosynthetic gene therapy for regeneration. *Biomaterials.* **2016**;75:25–36.
93. Xue L, Pan W, Jiang G, et al. Transgenic *Dunaliella salina* as a bioreactor. US patent application. US20030066107 A1. **2003**.

94. Yang Z, Lih Y, Chen F, et al. Expression of human soluble TRAIL in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Chin Sci Bull.* **2006**;51(14):1703–1709.
95. Somchai P, Jitrakorn S, Thitamadee S, et al. Use of microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* for production of double-stranded RNA against shrimp virus. *Aquacult Rep.* **2016**;3:178–183.
96. Kim DH, Kim YT, Cho JJ, et al. Stable integration and functional expression of flounder growth hormone gene in transformed microalga, *Chlorella ellipsoidea*. *Mar Biotechnol.* **2002**;4(1):63–73.
97. Li SS, Tsai HJ. Transgenic microalgae as a non-antibiotic bactericide producer to defend against bacterial pathogen infection in the fish digestive tract. *Fish Shellfish Immunol.* **2009**;26(2):316–325.
98. Hawkins RL, Nakamura M. Expression of human growth hormone by the eukaryotic alga, *Chlorella*. *Curr Microbiol.* **1999**;38(6):335–341.
99. Chen Y, Wang YQ, Sun YR, et al. Highly efficient expression of rabbit neutrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr Genet.* **2001**;39(5–6):365–370.
100. Eichler-Stahlberg A, Weisheit W, Ruecker O, et al. Strategies to facilitate transgene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta.* **2009**;229(4):873–883.
101. Michelet L, Lefebvre-Legendre L, Burr SE, et al. Enhanced chloroplast transgene expression in a nuclear mutant of *Chlamydomonas*. *Plant Biotechnol J.* **2011**;9:565–574.
102. Chai XJ, Chen HX, Xu WQ, et al. Expression of soybean Kunitz trypsin inhibitor gene SKTI in *Dunaliella salina*. *J Appl Phycol.* **2013**;25(1):139–144.
103. Wannathong T, Waterhouse JC, Young RE, et al. New tools for chloroplast genetic engineering allow the synthesis of human growth hormone in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2016**;100(12):5467–5477.
104. Faè M, Accossato S, Cella R, et al. Comparison of transplastomic *Chlamydomonas reinhardtii* and *Nicotiana tabacum* expression system for the production of a bacterial endoglucanase. *Appl Microbiol Biotechnol.* **2017**;101(10):4085–4092.
105. Dong B, Cheng RQ, Liu QY, et al. Multimer of the antimicrobial peptide Mytichitin-A expressed in *Chlamydomonas reinhardtii* exerts a broader antibacterial spectrum and increased potency. *J Biosci Bioeng.* **2017b**;125(2):175–179.
106. Baier T, Kros D, Feiner RC, et al. Engineered fusion proteins for efficient protein secretion and purification of a human growth factor from the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *ACS Synth Biol.* **2018a**;7(11):2547–2557.
107. Dreesen IA, Charpin-El, Hamri G, Fussenegger M. Heat-stable oral alga-based vaccine protects mice from *Staphylococcus aureus* infection. *J Biotechnol.* **2010**;145:273–280.
- **Presents a protective vaccine produced in green algae.**
108. Gregory JA, Topol AB, Doerner DZ, et al. Alga-produced cholera toxin-Pfs25 fusion proteins as oral vaccines. *Appl Environ Microbiol.* **2013**;79(13):3917–3925.
109. Roth J, Zuber C, Park S, et al. Protein N-glycosylation, protein folding, and protein quality control. *Mol Cells.* **2010**;30(6):497–506.
110. Van Ree R, Cabanes-Macheteau M, Akkerdaas J, et al. Beta (1,2)-xylose and alpha (1,3)-fucose residues have a strong contribution in IgE binding to plant glycoallergens. *J Biol Chem.* **2000**;275(15):11451–11458.
111. Shaaltiel Y, Bartfeld D, Hashmueli S, et al. Production of glucocerebrosidase with terminal mannose glycans for enzyme replacement therapy of Gaucher's disease using a plant cell system. *Plant Biotechnol J.* **2007**;5(5):579–590.
112. Bosch D, Schots A. Plant glycans: friend or foe in vaccine development? *Expert Rev Vaccines.* **2010**;9(8):835–842.
113. Wang Q, Yin B, Chung CY, et al. Glycoengineering of CHO cells to improve product quality. *Methods Mol Biol.* **2017**;1603:25–44.
114. Cockburn I, Long G. The importance of patents to innovation: updated cross-industry comparisons with biopharmaceuticals. *Expert Opin Ther Pat.* **2015**;25(7):739–742.
115. Chichester JA, Green BJ, Jones RM, et al. Safety and immunogenicity of a plant-produced Pfs25 virus-like particle as a transmission blocking vaccine against malaria: a Phase 1 dose-escalation study in healthy adults. *Vaccine.* **2018**;36(39):5865–5871.
116. Mor TS. Molecular pharming's foot in the FDA's door: protalix's trailblazing story. *Biotechnol Lett.* **2015**;37(11):2147–2150.
117. Pillet S, Aubin É, Trépanier S, et al. Humoral and cell-mediated immune responses to H5N1 plant-made virus-like particle vaccine are differentially impacted by alum and GLA-SE adjuvants in a Phase 2 clinical trial. *NPJ Vaccines.* **2018**;3:3.
118. Kesik-Brodacka M. Progress in biopharmaceutical development. *Biotechnol Appl Biochem.* **2018**;65(3):306–322.
119. McCamish M, Yoon W, McKay J. Biosimilars: biologics that meet patients' needs and healthcare economics. *Am J Manag Care.* **2016**;22(13 Suppl):S439–S442.
120. Stevenson JG. Clinical data and regulatory issues of biosimilar products. *Am J Manag Care.* **2015**;21(16 Suppl):s320–s330.
121. Daller J. Biosimilars: a consideration of the regulations in the united states and european union. *Regul Toxicol Pharmacol.* **2016**;76:199–208.
122. Klimyuk V, Pogue G, Herz S, et al. Production of recombinant antigens and antibodies in *Nicotiana benthamiana* using 'magnification' technology: GMP-compliant facilities for small-and large-scale manufacturing. *Curr Top Microbiol Immunol.* **2014**;375:127–154.
123. Pillet S, Couillard J, Trépanier S, et al. Immunogenicity and safety of a quadrivalent plant-derived virus like particle influenza vaccine candidate—Two randomized Phase II clinical trials in 18 to 49 and ≥ 50 years old adults. *PLoS One.* **2019**;14(6):e0216533.