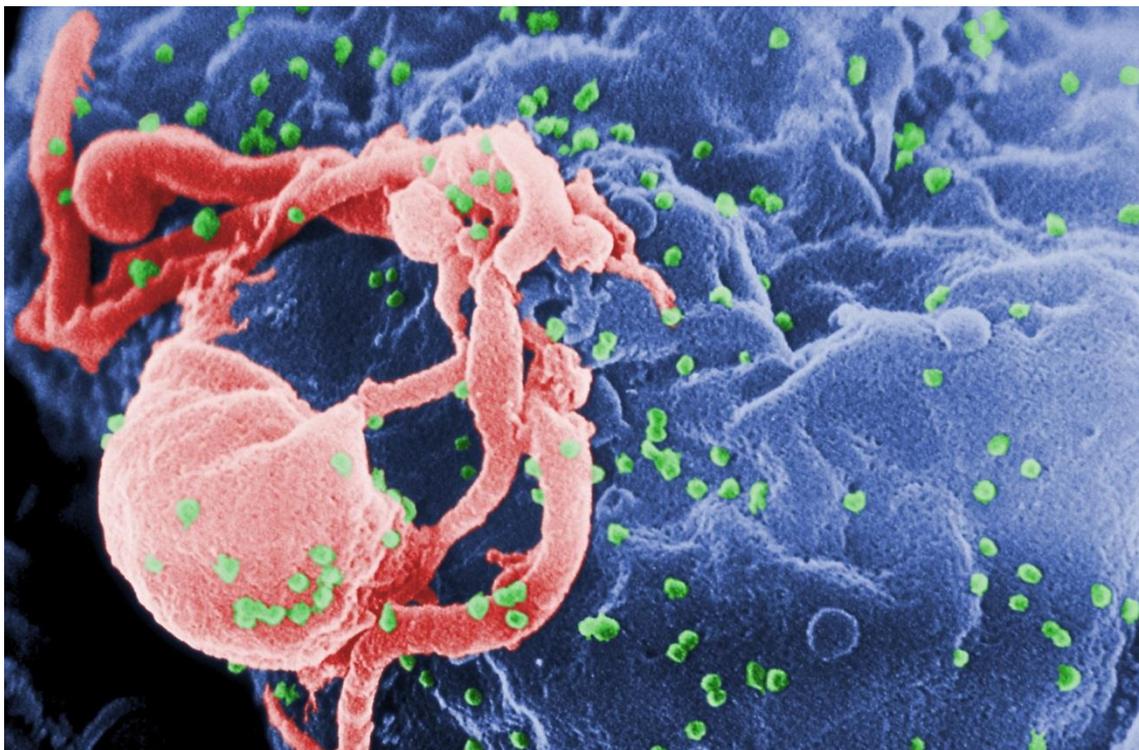


TRABAJO DE FIN DE GRADO



GRADO EN MEDICINA

Diseño de proteínas terapéuticas.

Therapeutic protein design.

Autor: Domingo Fernández Vecilla

Director: Gabriel Moncalián Montes



**FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA**

Índice

- 1. Introducción.**
- 2. Biotecnología, ADN recombinante y proteínas terapéuticas.**
- 3. Insulina, la primera proteína recombinante.**
- 4. Como se crean las proteínas recombinantes.**
 - 4.1. Los sistemas de expresión.**
 - 4.2. El diseño de proteínas.**
- 5. Principales grupos de proteínas terapéuticas**
- 6. ¿Qué nos depara el futuro de la biotecnología en el campo de las proteínas recombinantes?**
- 7. Referencias y bibliografía.**

1. INTRODUCCIÓN

Durante la segunda mitad del siglo XX se lograron importantes avances en el campo de la biología, que fueron fundamentales para el desarrollo de lo que hoy se conoce como biotecnología. Uno de los hitos científicos más importantes para el campo de la biología y para la ciencia en general, fue la determinación de la estructura de doble hélice del ADN. Este hecho, que les valió a los investigadores James Watson y Francis Crickⁱ el premio Nobel de medicina en 1962, permitió comprender cómo el ADN determina los caracteres de un individuo y cómo se transmiten de una generación a la siguiente. A partir de este hecho se pudo conocer que todos los organismos, desde los más simples hasta los más complejos, tienen un código genético común. Esto significa que el ADN de un organismo está “escrito” en un código que puede ser interpretado y traducido por las células de otros organismos.

El desarrollo de la ingeniería genética en los últimos tiempos ha dinamitado el avance de la industria biotecnológica aplicada a la sanidad humana y animal, que ha supuesto una consecuente mejora de la calidad de vida. La utilización de proteínas recombinantes como productos terapéuticos, como vacunas y como herramientas en ensayos de diagnóstico está siendo cada vez más extendida, ya que son productos que nos están facilitando el acercamiento tanto terapéutico como diagnóstico a numerosas patologías que antes no creíamos curables. En las últimas décadas, gracias a la aplicación de las técnicas de ingeniería genética podemos usar el ADN recombinante (previa manipulación) para producir proteínas recombinantes, es decir, proteínas a partir de una especie o una línea celular distinta a la original. Como resultado de la aplicación de estas tecnologías, surgió hace tres décadas, la biotecnología aplicada a la mejora de la salud.

2. Biotecnología, ADN recombinante y proteínas terapéuticas.

Para entrar de lleno en el tema de las proteínas terapéuticas debemos comenzar primero por uno de los pilares fundamentales. Por lo tanto, si empezamos por la base, se debe definir qué es la **biotecnología**ⁱⁱ y cuáles

pueden ser sus aplicaciones. Así pues, la biotecnología consiste en la utilización de seres vivos sencillos (bacterias y levaduras) y células eucariotas en cultivo, cuyo metabolismo y capacidad de biosíntesis se utilizan para la fabricación de sustancias específicas aprovechables por el hombre. La biotecnología permite, gracias a la aplicación integrada de los conocimientos y técnicas de la bioquímica, la microbiología, la ingeniería química, y, sobre todo, la ingeniería genética, aprovechar en el plano tecnológico las propiedades de los microorganismos y los cultivos celulares. Permiten producir a partir de recursos renovables y disponibles en abundancia gran número de sustancias y compuestos. Se ha producido un claro avance en este campo quedando claramente diferenciadas la biotecnología tradicional de la moderna. La biotecnología tradicional empleaba microorganismos, como bacterias, levaduras y mohos, para producir diferentes alimentos, como el pan, queso, vino o cerveza. En cambio, hoy en día utiliza microorganismos modificados genéticamente, mediante técnicas de ingeniería genética. Llegamos así a una parte importante para este trabajo, ya que hemos mencionado a la ingeniería genética, una rama de la biotecnología que se basa en la manipulación de genes para obtener sustancias específicas aprovechables por el hombre. Se trata de aislar el gen que produce la sustancia, e introducirlo en otro ser vivo que sea más sencillo (y rentable, desde el punto de vista de la industria farmacéutica) de manipular; lo que se consigue es modificar las características hereditarias de un organismo de una forma dirigida por el hombre, alterando su material genético.

Si nos paramos a pensar en las aplicaciones, la lista de posibilidades es cuanto menos extensa, ya que se puede aplicar en muy distintos campos como alimentación, agricultura, ganadería, medio ambiente o medicina. Entornos científicos como industriales cada vez más especializados y diversos, hacen uso en mayor o menor medida de la biotecnología como herramienta para sus procesos. Esta diversidad ha determinado la necesidad de un sistema de clasificación de los usos de la biotecnología que los agrupe en función de sus características comunes o de su utilidad final. Como resultado, actualmente se consideran cinco agrupaciones de los usos biotecnológicos identificados mediante un sistema de coloresⁱⁱⁱ. Así las clasificaremos como:

- **Biotecnología roja**: usos relacionados con la medicina, como las proteínas terapéuticas (de las que hablaremos en el punto 4), la terapia génica o la terapia celular y la medicina regenerativa.
- **Biotecnología blanca**: usos relacionados con los procesos industriales, como el desarrollo de nuevas fuente de energía sostenible (biocombustibles) o el diseño y producción de nuevos materiales de usos cotidianos (plásticos y textiles).
- **Biotecnología gris**: aplicaciones directas de la biotecnología al medio ambiente como la aplicación de la biología molecular al análisis genético de poblaciones y especies integrantes de ecosistemas, su comparación y catalogación. Así como el uso de microorganismos y especies vegetales para el aislamiento y la eliminación de diferentes sustancias, como metales pesados e hidrocarburos.
- **Biotecnología verde**: se centra en la agricultura, como la creación de nuevas variedades de plantas de interés agropecuario o la clonación de vegetales.
- **Biotecnología azul**: se basa en la explotación de los recursos del mar para la generación de productos y aplicaciones de interés industrial. Sin duda, el uso de materias primas de origen marino es la biotecnología de mayor proyección en gran variedad de sectores. Dichas materias primas, en su mayoría hidrocoloides y gelificantes, ya están siendo ampliamente utilizados en alimentación, sanidad, depuración, etc. La medicina y la investigación son otros grandes beneficiarios del desarrollo de la biotecnología azul. Algunas moléculas marcadoras procedentes de organismos marinos son ya de uso cotidiano en investigación.

Pasamos a otro de los puntos fundamentales antes de hablar de las proteínas recombinantes, el **ADN recombinante**^{iv}. El ADN recombinante es una molécula de ADN artificial formada de manera deliberada in vitro por la unión de secuencias de ADN provenientes de dos organismos distintos que normalmente no se encuentran juntos. Al introducirse este ADN recombinante en un organismo, se produce una modificación genética que permite la adición de una nueva secuencia de ADN al organismo, conllevando a la modificación de rasgos existentes o la expresión de nuevos rasgos. La producción de una proteína no presente en un organismo determinado y producidas a partir de ADN recombinante, se llaman proteínas recombinantes. En términos generales y siendo pragmáticos

(aunque luego hablaremos en profundidad de la producción de proteínas terapéuticas), el ADN recombinante es resultado del uso de diversas técnicas que los biólogos moleculares utilizan para manipular las moléculas de ADN y difiere de la recombinación genética que ocurre sin intervención dentro de la célula. El proceso consiste en tomar una molécula de ADN de un organismo, sea virus, planta o una bacteria y en el laboratorio manipularla y ponerla de nuevo dentro de otro organismo.

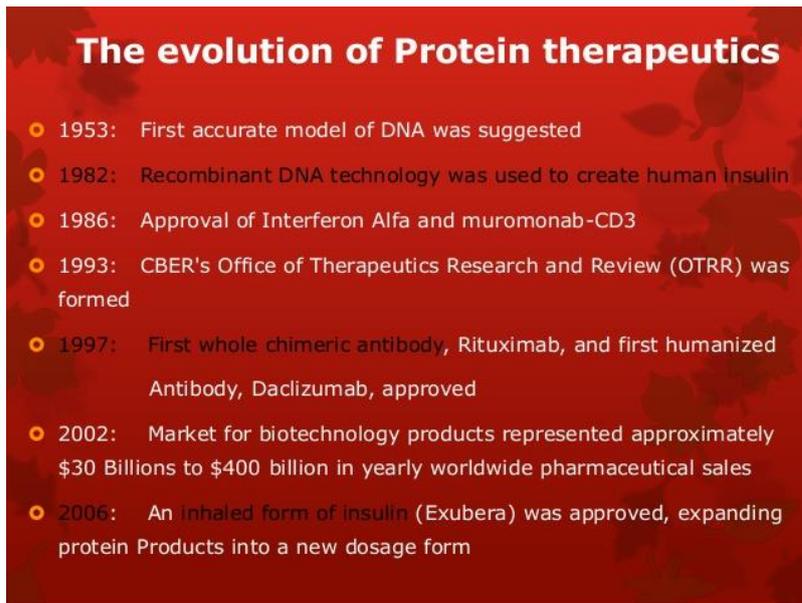


Ilustración 1. Evolución de las proteínas terapéuticas.

mostramos el bagaje histórico de las proteínas terapéuticas desde que Watson y Crick descubrieron el primer modelo realmente fiel de la estructura de doble hélice característica de DNA en 1953. Después se utilizó la tecnología del ADN recombinante para crear la primera proteína terapéutica, hecho muy importante que inició la carrera para crear nuevas, mejores y más económicas opciones terapéuticas a la hora de tratar enfermedades de manera más eficiente. Pasando por otras muchas fechas importantes para la historia de las proteínas terapéuticas llegamos a la aprobación por parte de la FDA en 1997 del primer anticuerpo monoclonal quimérico llamado Rituximab^{vi} y al primer anticuerpo humano Dacilizumab. La incorporación de la inmunoterapia en las hemopatías malignas ha provocado un favorable cambio en las opciones terapéuticas de los linfomas no hodgkinianos (LNH). Esta se basa en el uso de los anticuerpos monoclonales que atacan blancos específicos en los receptores de las células malignas, tales como el antígeno CD20 presente en un alto

Las **proteínas recombinantes^v**, también llamadas proteínas quiméricas o proteínas heterólogas, son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado en una especie o una línea celular distinta a la célula original. En el siguiente cuadro adjunto

porcentaje de las células B de los síndromes linfoproliferativos crónicos. El Rituximab (anti-CD20) tiene como uso indicado el tratamiento de linfomas no hodgkinianos, leucemia linfocítica crónica y la artritis reumatoide. Por su parte, el Dacilizumab es un anticuerpo IgG humanizado monoclonal que se une específicamente a la subunidad alfa del receptor de interleukina-2 y su uso está indicado en la profilaxis del rechazo agudo de órganos en pacientes que reciben trasplantes renales (se utiliza como parte de un inmunosupresor régimen que incluye ciclosporina y corticosteroides) y en la detención del progreso de la esclerosis múltiple.

Proteínas recombinantes que hoy se comercializan y emplean como fármacos en humanos.

PRODUCTO	INDICACIÓN TERAPÉUTICA
Factores de coagulación	Hemofilia
Insulina	Diabetes mellitus
Hormona de crecimiento	Deficiencia de la hormona en niños
Eritropoyetina (EPO)	Anemia
Interferón alfa	Hepatitis B y C, cáncer
Vacuna anti-hepatitis B	Inmunización contra hepatitis B
Anticuerpos monoclonales recombinantes	Asma, artritis reumatoidea
Proteína C	Sepsis severa
Beta-glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher
DNAasa	Fibrosis quística

Ilustración 2. Ejemplos de proteínas recombinantes y su aplicación.

Hoy en día existen muchos ejemplos de proteínas terapéuticas en el mercado que nos muestra lo importante que son estos productos en el campo de la biomedicina, como el interferón humano que

se utiliza para el tratamiento de la esclerosis múltiple, la hepatitis B y C, el factor VIII de la coagulación contra la hemofilia o la hormona de crecimiento. Además, también se están utilizando en ensayos de diagnóstico, facilitando enormemente la detección de enfermedades que requerían largos y complejos análisis. Las proteínas recombinantes han supuesto un gran avance en el campo de las vacunas y están siendo de gran ayuda en la lucha contra las enfermedades víricas. Hasta hace poco tiempo, las vacunas virales se preparaban utilizando virus atenuados o inactivados y, aunque el uso de este tipo de vacunas ha ayudado muchísimo en el control de las enfermedades, en ocasiones, han surgido problemas debido a una inactivación o atenuación inadecuadas. Las proteínas estructurales

que forman el "esqueleto" de los virus, lo que se llama la cápsida viral, son las principales dianas a la hora diseñar y obtener una vacuna. Son proteínas, capaces de generar una respuesta inmune eficaz que servirá para luchar contra ese virus si somos infectados por él.

3. Insulina, la primera proteína recombinante.

Desde su descubrimiento, la insulina^{vii} se ha convertido en una de las moléculas más estudiadas de la historia de la medicina. Como todos sabemos, la insulina es una proteína relacionada con la diabetes, una enfermedad que afecta a un amplio porcentaje de la población. En la diabetes tipo 1, el cuerpo no produce insulina. En la diabetes tipo 2, la más común, el cuerpo no produce o no usa la insulina de manera adecuada. Sin suficiente insulina, la glucosa permanece en la sangre.

No obstante, el vínculo entre insulina y diabetes no ha estado siempre tan claro. No fue hasta 1922 cuando se administró por primera vez insulina para tratar la diabetes, concretamente un extracto de hígado de ganado que, debido a las impurezas presentes, producía grandes reacciones alérgicas.

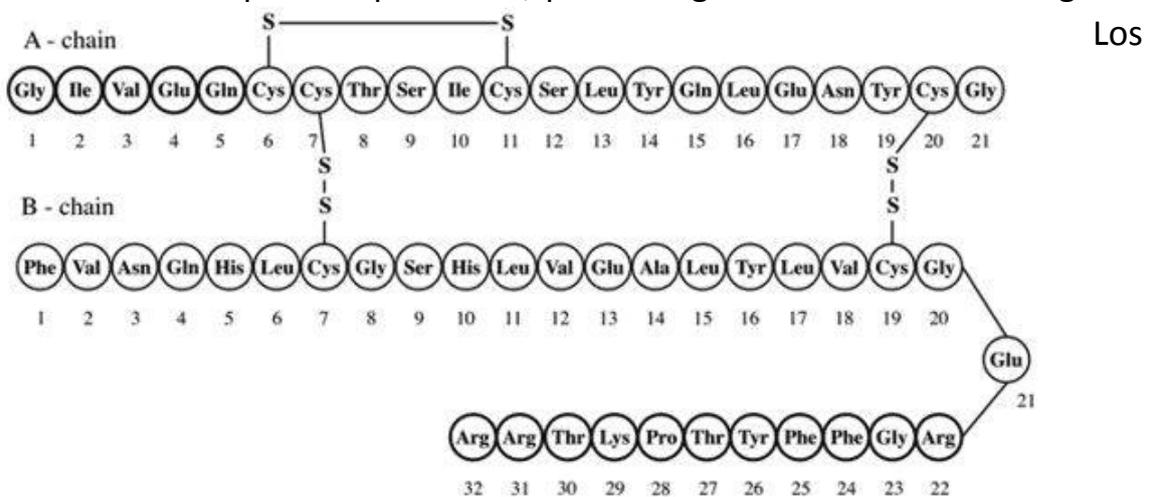


Ilustración 3. Estructura primaria de la insulina.

experimentos avanzaron, intentando encontrar la dosis exacta necesaria para una correcta respuesta del organismo, obteniendo resultados más o menos satisfactorios. La revolución se inicia en 1926, año en que se consigue la cristalización de la proteína. Posteriormente, en 1955, Sanger consigue descifrar su composición, obteniendo que estaba formada por dos cadenas de 21 y 30 aminoácidos (cadenas A y B, respectivamente) unidas por puentes disulfuro establecidos entre varios residuos de cisteína. El

conocimiento de la secuencia y estructura de una molécula es vital, pues ayudó a entender cómo funciona en el organismo, las interacciones que se producen... Hay que destacar que la insulina fue una de las primeras proteínas cristalizadas, y la primera en ser secuenciada. Por aquel entonces, 60 años después del primer ensayo realizado en humanos, la insulina que se administraba a los diabéticos se obtenía de vacas y cerdos, con un efecto muy similar al producido por la variante humana, pero también con numerosos problemas de tipo alérgico derivados de las impurezas con las que se obtenía, como por ejemplo erupciones cutáneas. En 1963, la insulina se convirtió en la primera proteína en ser sintetizada *in vitro*, por Meinhofer y colaboradores, pero con un rendimiento bastante pobre, lo que impedía su utilización masiva contra la diabetes.

Así llegamos a la insulina recombinante ya que, en el año 1978, gracias al desarrollo de la ingeniería genética se consigue la síntesis de la insulina mediante técnicas biotecnológicas⁴ (una vez más, es la primera proteína en la que se llevan a cabo). El procedimiento llevado a cabo fue muy ingenioso, utilizando las bacterias *Escherichia coli* como factorías en miniatura para producir de forma separada las cadenas A y B de la insulina humana, introduciendo para ello los genes que las codifican en las bacterias mediante un vector (pBR322). Posteriormente se llevaba a cabo la purificación, plegamiento y unión *in vitro* de las cadenas, mediante la

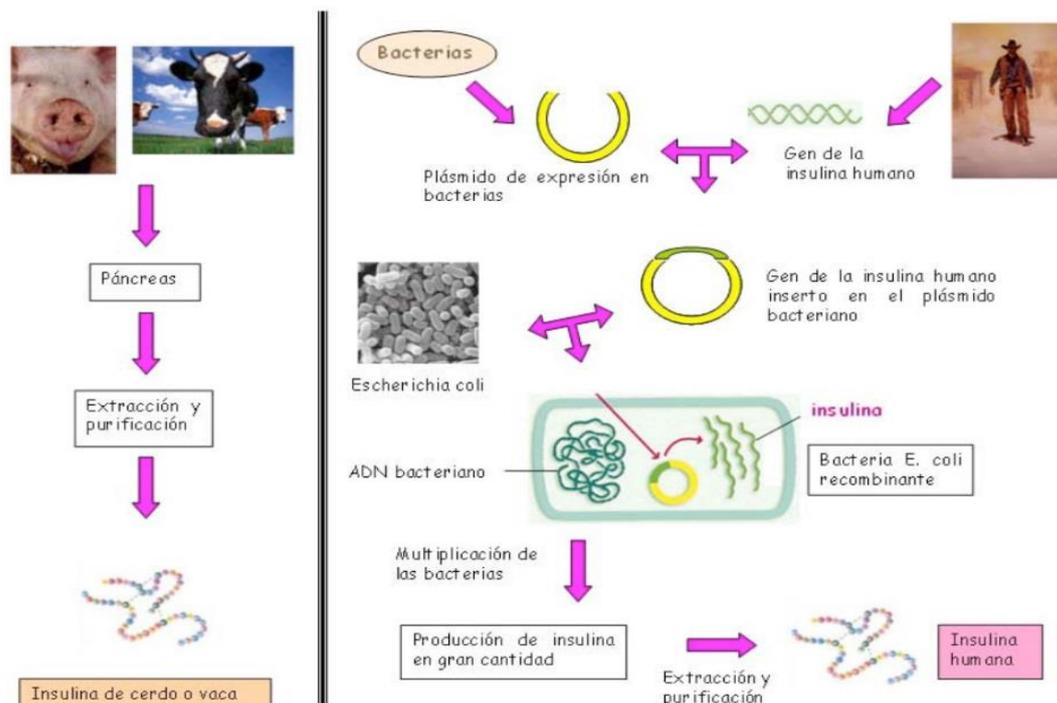


Ilustración 4. Proceso de producción de la insulina.

oxidación de las cisteínas para formar los puentes disulfuro de la proteína activa. El resultado fue una insulina humana (denominada comercialmente *Humulin*), más barata de producir, potente y segura, ya que no mostraba los problemas que producían las homólogas animales. Empezó a distribuirse a principios de los años 80 como tratamiento contra la diabetes, siendo la primera proteína recombinante aprobada como medicamento.

Hoy en día, prácticamente todos los diabéticos son tratados con algún tipo de insulina recombinante, pues se han conseguido numerosos análogos con diferentes cualidades (de efecto retardado, más potente...). No obstante, la investigación no termina aquí. En los últimos años se está consiguiendo que otros organismos genéticamente modificados produzcan insulina humana, con numerosas ventajas. Por ejemplo, científicos argentinos han obtenido vacas transgénicas que producen leche enriquecida en pro-insulina humana⁵, que evitarían tener que purificar la proteína, pues únicamente habría que consumir la leche. Lo mismo ocurre con el cártamo (*Carthamus tinctorius* L., azafrán bastardo), que se ha modificado para que produzca insulina humana en sus semillas.

4. Como se crean las proteínas recombinantes.

En este apartado comentaremos los sistemas de expresión que más se utilizan para producir proteínas terapéuticas y posteriormente nos acercaremos al diseño de proteínas.

4.1. Los sistemas de expresión^{viii}

La elección del microorganismo para expresar la proteína de interés depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la proteína que se quiera producir. Los sistemas procariotas expresan proteínas solubles o en forma de agregados intracelulares o cuerpos de inclusión, sin plegamiento, lo que implica su estructuración in-vitro. Los sistemas eucariotas introducen modificaciones postraduccionales como

glicosilaciones, eliminación de la metionina inicial y ruptura proteolítica de un precursor, entre otros, asemejando las proteínas recombinantes a las endógenas. **Escherichia coli** es uno de los modelos más simples para la

BACTERIAS	
<i>Escherichia coli</i>	
VENTAJAS	DESVENTAJAS
Buen nivel de conocimiento sobre su fisiología y genética. Se cuenta con gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes. Fácil manipulación. Cultivos baratos con altas densidades celulares. Niveles moderados de producción de la proteína recombinante.	Ineficiente secreción de la proteína al medio de cultivo. Formación de cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma celular. La síntesis de las proteínas heterólogas induce a un incremento de la proteólisis celular. Realiza pocas modificaciones postraduccionales. Generación de endotoxinas dañinas para la salud humana y animal.
<i>Bacillus subtilis</i>	
Secreción de la proteína heteróloga.	Secreta una gran cantidad de proteasas afectando el rendimiento del producto recombinante. Dispone de pocos vectores de expresión y elementos promotores para la regulación de la expresión de los transgenes comparado con <i>E. coli</i> . Menor estabilidad genética de los plásmidos incorporados en el hospedero.
LEVADURAS	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
Sistema eucariota mejor caracterizado desde el punto de vista de la Biología Molecular y la Fisiología. Genoma totalmente secuenciado. Vectores de expresión y cepas disponibles. Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial. Cultivos baratos. Se producen altos niveles de la proteína recombinante. Realiza modificaciones postraduccionales. Es considerado como organismo GRAS.	Produce hiperglicosilaciones. Baja eficiencia en la secreción de la proteína heteróloga.
<i>Pichia pastoris</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Emplea los promotores más fuertes y eficientemente regulados de los conocidos. • Vectores de expresión y cepas disponibles. • Manipulación sencilla a nivel de laboratorio e industrial. • Secreción eficiente de la proteína heteróloga. • Medios de cultivos son baratos y formulados libre de toxinas y pirógenos. • Los cultivos alcanzan altas densidades celulares. • Altos niveles de producción. • Bajos niveles de secreción de proteínas endógenas facilitando la purificación de la proteína heteróloga. 	<ul style="list-style-type: none"> • Produce patrones glicosilaciones no deseables para algunas proteínas. • Actividad proteolítica. • Algunas proteínas no se producen de forma eficiente.

producción de proteínas recombinantes. En el mercado, cerca del 30% de las PT «sencillas» son producidas en *E. coli*, entre ellas algunas citoquinas en forma soluble o en forma de cuerpo de inclusión. El modelo de producción en *E. coli* alcanza los más altos niveles de productividad de proteína de interés, presentando grandes

Ventajas y desventajas de los distintos sistemas de expresión

ventajas en los procesos de escalamiento. Sin embargo, también impone limitaciones como la selección de la proteína que se producirá, ya que las bacterias carecen de la capacidad de realizar la mayor parte de las modificaciones postraduccionales de la proteína. Por otro lado, la selección de los sistemas bacterianos a ser utilizados en la industria depende del tipo y el uso del producto, como también de los asuntos legales de propiedad

intelectual. Un alto número de nuevos vectores de expresión han sido desarrollados últimamente. Sin embargo, el uso de bacterias en la industria es muy limitado y cepas derivadas de *E. coli* K-12 son normalmente las seleccionadas.

Algunas levaduras como **Saccharomyces cerevisiae, Hansenula polymorpha y Pichia pastoris** están entre las levaduras más utilizadas en la industria, por su alta velocidad de crecimiento, adaptabilidad a los cambios de escala en biorreactores y la posibilidad de alcanzar altas concentraciones celulares, redituando en altas productividades. Otra gran ventaja es que estos microorganismos no producen endotoxinas, y además son capaces de glicosilar proteínas de manera similar a las líneas celulares animales. Por otro lado, actualmente cerca del 60% de proteínas recombinantes terapéuticas aprobadas para consumo humano, son producidas en células de mamífero de ovario de hámster chino (CHO) y de riñón de hámster bebé (BHK), ya que presentan la capacidad de producir las proteínas de manera bien plegada, con las modificaciones postraduccionales necesarias para ser altamente similares a las endógenas. Sin embargo, los costos asociados a los medios de cultivo y adaptación de las células animales hacen de este sistema el más costoso para la producción de una proteína en especial. En la tabla adjunta de la página anterior vemos una comparación con las ventajas y desventajas de usar cada uno de los sistemas de expresión descritos anteriormente.

4.2. Diseño de proteínas terapéuticas.

Para ello vamos a centrarnos en un concepto muy importante en el campo de la biotecnología, la ingeniería de proteínas. La ingeniería proteica aplica conocimientos de matemáticas, economía y biología molecular al diseño de proteínas. De esta forma se sigue un proceso cíclico que alterna etapas en las que se planean y ejecutan los cambios a realizar con otras en las que se evalúa el resultado de los mismos. Existen dos métodos para el diseño de proteínas: el diseño racional (*rational design*) y la evolución dirigida. Pero antes de entrar en materia debemos hablar de otro concepto básico

para el diseño de proteínas y que es fundamental, la estructura tridimensional de la proteína.^{ix}

De modo que debemos entender el porqué es importante estudiar la estructura tridimensional de una proteína. La

estructura

tridimensional de una proteína es específica de cada una de ellas y determina su función, y las características físicas y químicas de la



Ilustración 5. Estructura terciaria de una proteína.

molécula dependen de ese nivel de plegamiento. Las regiones de la proteína con una estructura secundaria definida se llaman dominios. La estructura terciaria define las interacciones entre los diferentes dominios que la forman. El plegamiento no es inmediato, primero se agrupan conjuntos de estructuras denominadas dominios que luego se articulan para formar la estructura terciaria definitiva. Este plegamiento está facilitado por uniones denominadas puentes disulfuro, que se establecen entre los átomos de azufre del aminoácido cisteína. Las proteínas mantienen su estructura y función dentro de la célula, pero un cambio en las condiciones puede suponer la alteración de su estructura terciaria, llegando incluso a perder su función. La pérdida de la estructura terciaria de una proteína supone la pérdida de su función. Se habla de desnaturalización cuando el cambio en la estructura de la proteína es tan grande que ésta no puede mantener su función. La mayoría de las proteínas se pueden desnaturalizar por calor, pH extremos, disolventes, o detergentes. La desnaturalización no supone la ruptura de los enlaces covalentes, pero sí de las interacciones débiles que mantienen la estructura tridimensional.

Ahora que ya sabemos de la importancia de la estructura tridimensional de una proteína vamos a hablar de los dos tipos de técnicas que podemos usar a la hora de diseñar una proteína concreta y con una función específica. Así,

por un lado tenemos el método de **mutagénesis dirigida o diseño racional** de proteínas en el que seguimos unos pasos:

- Un análisis estructural de la proteína que queremos modificar, de modo que a través de difracción de rayos x o resonancia magnética nuclear podemos obtener la estructura tridimensional, cuál es su función y nivel de estabilidad.
- El segundo paso es el de diseño y predicción de la proteína mutante. En lo que al diseño se refiere, la ingeniería de proteínas se encarga de modelar las propiedades de una proteína para que cumpla la función que queremos en el medio que necesitamos que la cumpla. Así vamos a crear una proteína termoestable porque necesitamos que siga realizando su función en condiciones de temperatura más elevada y que no se desnaturalice, por ejemplo o estabilidad frente a la oxidación, a metales pesados o frente a pH. En la predicción se utilizan programas específicos de modelado proteico para la visualización, manipulación y análisis de proteínas nativas, de cambios sobre la dinámica proteica, de la influencia de una mutación concreta sobre el plegamiento proteico...

- El tercer paso es la mutagénesis dirigida, es decir, el de introducir la mutación en una secuencia de aminoácidos específica para modelar la proteína nativa a nuestra voluntad.

Objetivo	Estrategia
Termoestabilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Introducción de puentes disulfuro • Incremento de puentes de hidrogeno • Incremento de las interacciones hidrofobicas • Incremento de las interacciones iónicas
Estabilidad frente a la oxidación	<ul style="list-style-type: none"> • Conversión de Cys por Ala o Ser • Conversión de Met por Gln, Val, Ile o Leu • Conversión de Trp por Phe o Tyr
Estabilidad frente a metales pesados	<ul style="list-style-type: none"> • Conversión de Cys por Ala o Ser • Conversión de Met por Gln, Val, Ile o Leu • Alteración de los grupos carboxilo de la superficie
Estabilidad frente al pH	<ul style="list-style-type: none"> • Alteración de los grupos cargados de la superficie • Reemplazamiento interno de la His, Cys y Tyr • Reemplazamiento de pares iónicos internos

Ilustración 6. Estrategias para modificar las propiedades de una proteína.

- El siguiente paso es la purificación^{xi} de la proteína en el que obtenemos las proteínas sintetizadas por la bacteria, que son codificadas por un gen que se insertó en ella. Como muchas de estas proteínas no son liberadas al medio externo por las bacterias, es

necesario romper la pared celular para extraerlas y separarlas de otras, proceso conocido como purificación.

- El último paso es la de función y conformación, en el que se comprueba si la proteína recombinante nueva tiene las propiedades o cumple las funciones que nosotros hemos diseñado.

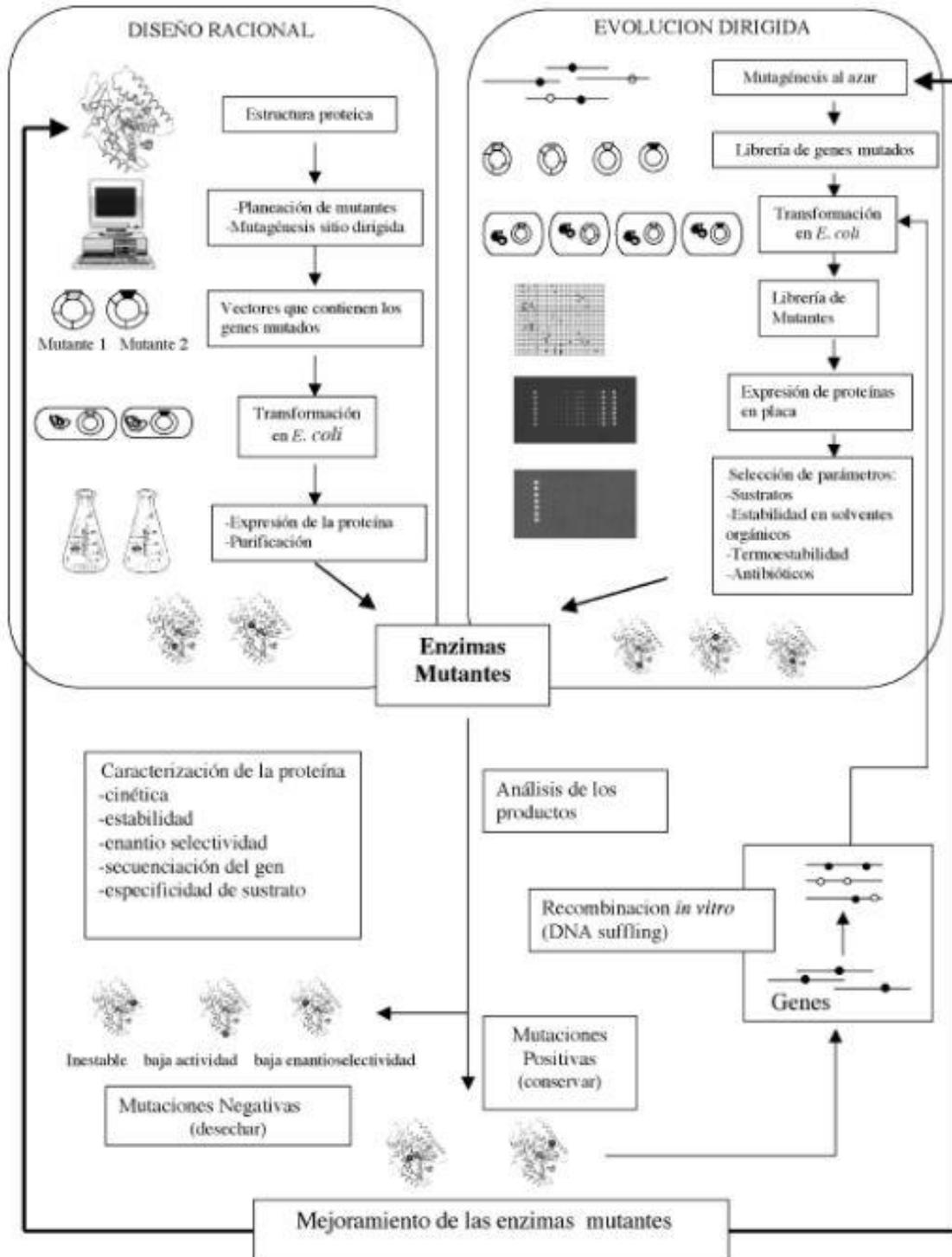


Ilustración 7. Esquema del diseño racional y de la evolución dirigida.

El otro método se denomina **evolución dirigida o mutagénesis al azar**^{xii}: comienza con un paso de mutación aleatoria del gen que codifica la enzima de interés. Éste proceso generalmente produce una librería entre 4000 y 6000 genes mutados (clones) que son expresados en el organismo huésped. Las librerías de proteínas son evaluadas en placas de microtitulación, usando ciertos parámetros de selección. Posteriormente la caracterización de la proteína y el análisis del producto permiten seleccionar las mutaciones deseadas y no deseadas. La recombinación in vitro por DNA shuffling, por ejemplo, puede ser usada para mejorar las propiedades y finalmente quedarnos con las mutaciones positivas, que suponen una mejora de las proteínas mutantes. Los dos enfoques de ingeniería proteica pueden ser repetidos y combinados hasta que el biocatalizador con las características deseadas sea generado.

5. Principales grupos de proteínas terapéuticas.

1. **Hormonas y factores de crecimiento**^{xiii}: La insulina humana ha sido la primera proteína recombinante que se ha comercializado, pero ya le hemos dedicado un punto anterior a hablar de ella dada su importancia histórica. Sólo comentar que posteriormente se han desarrollado otras insulinas modificadas buscando una mayor eficacia terapéutica y así por ejemplo, algunas insulinas modificadas pueden actuar de forma más rápida y otras, por el contrario, lo hacen más lentamente. El segundo producto terapéutico que salió al mercado farmacéutico fue la hormona de crecimiento humana (hGH). Debido a un fallo de diseño la primera hGH fue sintetizada en 1985 por Genentech en *E. coli* con una metionina adicional en posición N-terminal, por lo que no era exactamente igual a la hormona natural, que comienza por una fenilalanina. Esto hizo que, después otras compañías farmacéuticas pudieran comercializar sin problemas de patentes la verdadera hGH y cuyas aplicaciones son en niños con déficit de hormona de crecimiento, Sd. De Turner, niños con talla baja... Otras hormonas y factores de crecimiento se producen actualmente tanto en microorganismos, como *E. coli* y *S. cerevisiae*, como en cultivos de células de mamífero. De especial relevancia es el caso de la eritropoyetina (EPO), ya que es uno de los productos de mayor mercado gracias no a su uso farmacéutico para

Hormonas y factores de crecimiento de origen recombinante

Proteína	Unidad Terapéutica	Nombre comercial (compañía)	Sistema de protección	Año
Insulina	Diabetes	Humulin (Eli Lilly) Insuman (Hoechst AG)	<i>E. coli</i>	1982
Insulina	Diabetes	Novolin (Novo Nordisk)	<i>S. cerevisiae</i>	1991
Insulina Lispro	Diabetes	Humalog (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	1996
Insulina BioLyspan	Diabetes	Liprolog (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	1997
Insulina Aspart	Diabetes	NovoRapid (Novo Nordisk)	<i>S. cerevisiae</i>	1999
Insulina Glargine	Diabetes	Lantus (Aventis)	<i>E. coli</i>	2000
Hormona de crecimiento humana (hGH) (metionina N-terminal)	Deficiencia en niños	Protropin (Genentech)	<i>E. coli</i>	1985
Hormona de crecimiento humana (hGH)	Deficiencia en niños	Nutropin (Genentech)	<i>E. coli</i>	1994
		Bio Tropin (Biotechnology General)	Línea celular	
		Genotropin (Pharmacia & Upjohn)		
		Nandropin (Novo Nordisk)		
		Saizen (Serono Laboratories)		
		Serostim (Serono Laboratories)		
Glucagón	Hipoglucemia	Glucagon (Novo Nordisk)	<i>S. cerevisiae</i>	1998
Hormona estimulante del timoide (TSH, tirotropina)	Detección/tratamiento del cáncer de timoide	Thyrogen (Genzyme)	Células CHO	1998
Hormona folículo-estimulante (FSH)	Aovulación sup ovulación infertilidad	Gonal F (Ares-Serono)	Células CHO	1995
		Puregon N.V. (Organon)		
		Follistim (Organon)		
Eritropoyetina (EPO)	Tratamiento de la anemia	Epogen (Amgen)	Células CHO	1989
		Procrit (Ortho Biotech)		
		Neorecormo (Boehringer-Mannheim)		
Darbepoyetina alfa	Tratamiento de la anemia inducida por quimioterapia	Aranesp (Amgen)	Células CHO	2002
Eritropoyetina delta	Anemia renal	Dynepo (Aventis S.A.)	Línea celular humana	2002
Gonadotropina coriónica humana (hGC)	Tratamiento de la infertilidad	Ovidrel (Serono Laboratories)	Células CHO	2000
Calcitonina	Osteoporosis, enfermedad de Paget, hipercalcemia	Forcaltonin (Unigene UK Ltd.)	<i>E. coli</i>	1999
Hormona paratiroidea (PTH, Teriparatida)	Osteoporosis	Forteo (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	2002
Hormona luteinizante (LH)	Maduración de folículos	Lutropin alfa (Ares-Serono)	Células CHO	2001
PDGF	Úlceras diabéticas neuropáticas de las extremidades inferiores	Regenerex (Ortho-McNeil Pharmaceuticals, Janssen-Cilag)	<i>S. cerevisiae</i>	1997

Tabla 1. Hormonas y factores de crecimiento de origen recombinante.

combatir anemias, sino por su empleo como dopante en el deporte de élite. En este caso, es importante señalar que la EPO recombinante ha de producirse en células de mamífero, ya que para ser activa tiene que estar adecuadamente glicosilada. Algunas hormonas se obtienen aún a partir de fluidos humanos. Este es el caso de la hormona humana folículo-estimulante (FSH) que se obtiene a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas. La producción de la FSH recombinante tiene ciertas ventajas frente a la obtenida de la orina, ya que entre otras cosas evita la contaminación con la hormona luteinizante (LH), que también se encuentra en la orina. Sus aplicaciones son para mujeres con esterilidad con insuficiencia hipo o normogonadotrópica mediante la estimulación folicular o en técnicas de reproducción asistida. Cada vez son más las hormonas que se producen por tecnologías recombinantes con una alta eficiencia y a un coste razonable, pero lo que tal vez es más importante proporcionando una gran seguridad de uso (tabla nº 1).

2. **Anticuerpos monoclonales^{xiv} y ^{xv}:** son anticuerpos homogéneos producidos por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B descendiente de una sola y única célula madre, y una célula plasmática tumoral. Los investigadores Niels K. Jerne, Georges Köhler y Cesar Milstein, describieron la técnica que permitía el cultivo de hibridomas o células híbridas de linfocitos B con células plasmáticas tumorales de mieloma múltiple. Con esta fusión de dos

células, una programada para producir un anticuerpo específico pero que no se multiplica indefinidamente (linfocito) y otra inmortal con gran capacidad de crecimiento pero que no produce

ANTICUERPOS MONOCLONALES APROBADOS PARA USO TERAPÉUTICO

Anticuerpos monoclonales usados en la clínica			
Anticuerpo monoclonal	Antígeno	Mecanismo de acción	Indicaciones
Abciximab	Glicoproteína GpIIb/IIIa	Inhibe la agregación plaquetaria	Antitrombótico en intervenciones coronarias y angioplásticas
Adalimumab	TNF-alfa	Inhibe el efecto proinflamatorio de TNF-alfa	Enfermedad de Crohn, Artritis reumatoide, Espondilitis anquilopoyética, Psoriasis
Alemtuzumab	CD52	ADCC (Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity), CDC	Leucemia linfocítica crónica B
Basiliximab	CD25	Inhibe la activación de linfocitos T mediada por CD25	Prevención del rechazo agudo en trasplante de riñón
Bevacizumab	VEGF-A	Inhibe el efecto proangiogénico del VEGF-A	Cáncer colorrectal
Cetuximab	EGFR	Bloquea la unión de EGF a su receptor en las células tumorales y su proliferación ADCC, CDC	Cáncer colorrectal
Daclizumab	CD25	Inhibe la activación de linfocitos T mediada por CD25	Prevención del rechazo agudo en trasplante de riñón
Denosumab	RANKL	Inhibición de los osteoclastos	Osteoporosis en mujeres posmenopausicas con alto riesgo de fracturas
Edrecolomab	EpcAM, ADCC, CDC	Inhibe receptores de factores de crecimiento	Cáncer colorrectal
Efalizumab	CD11a	Inhibe la adhesión de linfocitos T al endotelio y su activación	Psoriasis, Retirado del mercado
FG-3019 ²	CTGB	Inhibe los niveles del factor de crecimiento de tejido conectivo	Fibrosis pulmonar
Gemtuzumab	CD33	Efecto citotóxico por daño al ADN y apoptosis	Leucemia mieloide aguda
Ibritumomab	CD20	Radioterapia, ADCC, CDC, apoptosis	Linfoma no Hodgkin
Igidasimab	CD61	Radioterapia, Receptor Bistué	Síndrome Manent
Infliximab	TNF-alfa	Inhibe el efecto proinflamatorio de TNF-alfa	Enfermedad de Crohn, Artritis reumatoide, Espondilitis anquilopoyética, Psoriasis

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales.

inmunoglobulina (célula de mieloma), se combina la información genética necesaria para la síntesis del anticuerpo deseado y una capacidad de síntesis proteica, permitiendo su multiplicación indefinida tanto in vitro como in vivo. Esta aportación a la ciencia Jerne, Köhler y Milstein les hizo merecedores del premio Nobel de Medicina en 1984. Los anticuerpos monoclonales se pueden utilizar en muchos campos (como en diagnóstico para detectar de forma específica marcadores tumorales o en infartos de miocardio) pero en el campo de la terapéutica se utilizan para evitar el rechazo tras un trasplante, en enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, lupus o artritis psoriásica; en tumores hematopoyéticos con linfoma y leucemia. En la tabla nº 2 se recogen todos los anticuerpos comercializados actualmente y sus aplicaciones.

3. Vacunas recombinantes^{xvi}: la primera vacuna recombinante que se aprobó para su uso farmacéutico fue la vacuna contra el virus de la hepatitis B. Hasta entonces la vacunación contra esta enfermedad se hacía con virus atenuados. La vacuna recombinante se produce en levaduras recombinantes que portan un gen que codifica una proteína de la cubierta del virus. Algunas toxinas que se utilizan para vacunas también se obtienen actualmente mediante Ingeniería Genética. La categoría más importante de los productos biofarmacéuticos que están actualmente en desarrollo es el de las vacunas, con casi 100 productos diferentes. La mayoría se están desarrollando para tratar o prevenir el cáncer. El resto se están desarrollando contra el SIDA y diferentes infecciones, fundamentalmente del aparato respiratorio. En la tabla nº 3 que se adjunta podemos ver las principales vacunas recombinantes en el mercado farmacéutico y sus principales aplicaciones.

Vacunas recombinantes

<i>Proteína</i>	<i>Utilidad terapéutica</i>	<i>Nombre comercial (Compañía)</i>	<i>Año</i>
HBsAg	Hepatitis B	Recombivax (Merck)	1986
Vacuna combinada entre hepatitis B recombinante y <i>H. influenzae</i> B	Hepatitis B y <i>H. influenzae</i> tipo B	Comvax (Merck) Procomvax (Pasteur Merieux MSD)	1996
Vacuna combinada entre hepatitis B recombinante, toxina diftérica, toxina tetánica, y <i>B. pertussis</i>	Tétanos, <i>B. pertussis</i> , difteria y hepatitis B	Tritanrix-HB (GlaxoSmith-Kline)	1996
Vacuna combinada entre toxinas diftérica, tetánica y hepatitis B recombinante	Tétanos, difteria y hepatitis B	Primavax (Pasteur Merieux MSD)	1998
OspA (lipoproteína de <i>B. burgdorferi</i>)	Enfermedad de Lyme	Lymerix (SmithKline Beecham)	1998
Vacuna con tres toxinas recombinantes	Tétanos, <i>B. pertussis</i> , y difteria	Triacelluvax (Chiron)	1999
Antígenos S, pre-S1, pre-S2 de hepatitis-B	Hepatitis B	Medeva Pharma	2000
Vacuna de hepatitis A inactivada y hepatitis B recombinante	Hepatitis A y B	Twinrix (GlaxoSmith-Kline)	2001
Vacuna combinada de toxinas diftérica, tetánica, <i>B. pertussis</i> , hepatitis B recombinante y virus de la polio inactivado	Difteria, tétanos, <i>B. pertussis</i> , hepatitis B y polio	Pediarix (GlaxoSmithKline)	2002
Vacuna conjugada anti neumocócica 7-valente con la proteína diftérica CRM-197	Inmunización contra neumococo en niños y ancianos	Prevenar (Wyeth-Lederle)	2002

Tabla 3. Vacunas recombinantes.

4. **Factores de coagulación^{xvii}**: cuando en el organismo se produce una hemorragia, un factor crítico para detenerla es la activación de la cascada de coagulación sanguínea. Este sistema está compuesto por una docena de proteínas presentes en el plasma, que actúan como un sistema de amplificación, de tal manera que un pequeño estímulo inicial da lugar a la formación final del coágulo de fibrina. La falta o deficiencia de una de las proteínas de alguno de los pasos intermedios de esta cascada de amplificación impide la formación de este coágulo y, por lo tanto, conduce a un problema grave para el organismo. En el centro de esta cascada se encuentran los factores VII, VIII y IX, cuya carencia genera los tipos más frecuentes de problemas hemofílicos que conducen a hemorragias prolongadas. La deficiencia del factor VIII genera la hemofilia A o hemofilia clásica, que supone un 80% de los casos de hemofilia en el mundo, en tanto que la deficiencia del factor IX conduce al otro tipo más frecuente, la hemofilia B. Los factores VIII y IX recombinantes, ampliamente utilizados en el tratamiento de la hemofilia A y B, respectivamente, fueron las primeras proteínas funcionales disponibles en el mercado para tratar los trastornos hemorrágicos. Ambos se utilizan, por lo general, en el tratamiento de la hemofilia A y B, respectivamente. Los productos de factores VIII, IX, y VIIa recombinantes han estado disponibles en los Estados Unidos desde los años 1990. Algunos productos de factor VIII recombinante contienen albúmina humana (una proteína del cuerpo) que es agregada como agente estabilizador. Ya que la albúmina proviene de sangre humana, es posible que tenga algún germen desconocido. Sin embargo, nunca se ha sabido que la albúmina haya transmitido algún virus. La albúmina recombinante^{xviii} que se agrega a al factor VIII recombinante es pasteurizada, de modo que evitan con eficacia cualquier riesgo potencial de bacterias animales, de priones, de virus y de enfermedades contagiosas de la proteína. Otros productos de factor VIII recombinante no usan la albúmina como estabilizador. Estos se consideran como los productos más seguros de factor VIII disponibles. La mayoría de las personas con hemofilia puede usar el concentrado de factor recombinante. Las personas con enfermedad de von Willebrand tienen que usar el concentrado de factor de von Willebrand. Esto significa que no pueden usar los productos de factor recombinante que usan las personas con hemofilia, ya que, esos

productos solamente contienen factor VIII o factor IX y no contienen este factor. Se ha producido un factor von Willebrand recombinante y se ha probado con éxito en perros con esta enfermedad por lo que

Factores de coagulación de la sangre de origen recombinante

<i>Proteína</i>	<i>Utilidad Terapéutica</i>	<i>Nombre comercial (compañía)</i>	<i>Sistema de producción</i>	<i>Año</i>
Factor VIII	Hemofilia A	Recombine (Baxter Healthcare/Genetics Institute) Bioclote (Centeon) Kogenate (Bayer) Helixate (Centeon)	Células CHO o BHK	1992
Factor VIII Moroctocog-alfa, (dominio B deletado)	Hemofilia A	ReFacto (Genetics Institute)	Células CHO	1999
Factor IX	Hemofilia B	Benefix (Genetics Institute)	Células CHO	1997
Factor VIIa	Hemofilias	NovoSeven (Novo-Nordisk)	Células BHK	1995
Hirudin	Anticoagulante	Revasc (Ciba Novartis/Europharm) Refludan (Hoechst Marion Roussel, Behringwerke AG)	<i>S. cerevisiae</i>	1997
Hirudin sin sulfato en Tyr 65	Anticoagulante	Desirudine (Ciba Europharm Ltd)	<i>S. cerevisiae</i>	1997
tPA Alteplasa	Infarto agudo de miocardio	Activase (Genentech)	Células CHO	1987
tPA Reteplasa (3 de los 5 dominios deletados)	Infarto agudo de miocardio	EcoKinase (Galenus Mannheim) Retavase (Boehringer Mannheim/Centocor) Rapilysin (Boehringer Mannheim)	<i>E. coli</i>	1996
Drotrecogin alfa activado (Proteína C humana activada)	Sepsis	Xigris (Eli Lilly and Co.)	Células humanas	2001

CHO: células de ovario de hámster chino. BHK: células de riñón de hámster.

Tabla 4. Factores de coagulación.

está en camino de comercializarse. En la tabla nº 4 podemos ver el número de factores de la coagulación recombinantes en el mercado y sus aplicaciones terapéuticas.

- 5. Interferones y otros inmunomoduladores^{xix}:** son un grupo de proteínas señalizadoras producidas y secretadas por las células hospedadoras como respuesta a la presencia de diversos patógenos, tales como virus, bacterias, parásitos y células tumorales. En un caso típico, una célula infectada por un virus secretará interferones, generando una activación en las defensas anti-virales en las células cercanas a dicha célula infectada. Los interferones son glicoproteínas que pertenecen a la gran clase de proteínas conocidas como citocinas, moléculas empleadas para la comunicación entre células para desencadenar a las defensas protectoras del sistema inmune que participan en la erradicación de patógenos. Los interferones obtienen su nombre por su capacidad de “interferir” con la replicación viral al proteger a las células de infecciones virales. Hay

tres tipos de interferones: interferón beta (fibroblastos), interferón alfa (leucocitos) e interferón gamma (linfocitos) y las principales aplicaciones de sus formas recombinantes utilizadas como fármacos son: hepatitis B y C, cáncer metastásico renal, sarcoma de Kaposi y leucemia mieloide crónica. Los interferones recombinantes son pegilados^{xx} de forma que se les añade un polietilenglicol (PEG) convirtiéndolos en un derivado muy estable, que recibe el nombre genérico de pegilado y que se caracteriza por presentar una gran velocidad de absorción y de eliminación que condiciona la persistencia de concentraciones plasmáticas durante un período de tiempo prolongado. Los cambios farmacocinéticos se relacionan directamente con el tamaño del PEG, por lo que cuanto mayor sea el peso molecular mayor será el retraso de la absorción y de la eliminación del pegilado. Asimismo hay otras citosinas que se utilizan sus formas recombinantes como terapia y son las interleucinas 2 y 11 cuyas aplicaciones son el carcinoma renal y la prevención de trombocitopenia inducida por quimioterapia, respectivamente. El resto de inmunomoduladores se recogen en la tabla nº 5.

Inmunomoduladores de origen recombinante

<i>Proteína</i>	<i>Unidad Terapéutica</i>	<i>Nombre comercial (compañía)</i>	<i>Sistema de producción</i>	<i>Año</i>
IFN- α 2a	Leucemia	Roferon A (Hoffmann La-Roche)	<i>E. coli</i>	1986
IFN- α (IFN tipo I sintético)	Hepatitis C crónica	Infergen (Amgen Yamanouchi Europe)	<i>E. coli</i>	1997
IFN- α 2b	Leucemia, Hepatitis B, C, y varios cánceres	Intron A (Schering Plough) Virtron (Schering Plough) Alfaronol (Schering Plough)	<i>E. coli</i>	1986
IFN- β 1b (difiere en C17S)	Esclerosis múltiple	Betaferon (Schering AG) Betaseron (Berlex Laboratories and Chiron)	<i>E. coli</i>	1993
IFN- β 1a	Esclerosis múltiple	Avonex (Biogen) Rebif (Ares Serono)	Células CHO	1996
IFN- γ 1b	Granulomatosis crónica	Actimmune (Genentech)	<i>E. coli</i>	1990
PEG-IFN- α 2a	Hepatitis C	Pegasys (Roche and Inhaled Therapeutics Inc.)	<i>E. coli</i>	2002
IFN- α 2b y ribavirina	Hepatitis C crónica	Rebetron (Schering Plough)	<i>E. coli</i>	1999
IL-2 (sin alanina N-terminal y con C125S)	Carcinoma renal	Proleukin (Chiron)	<i>E. coli</i>	1992
IL-11 (sin prolina N-terminal)	Prevención de trombocitopenia inducida por quimioterapia	Neumega (Genetics Institute)	<i>E. coli</i>	1997
Fusión IL-2-toxina diftérica	Linfoma cutáneo de células T	Ontak (Sugen/Ligand Pharmaceuticals)	<i>E. coli</i>	1999
Anakinra (antagonista no glicosilado del receptor de IL1) (metionina N-terminal)	Artritis reumatoide	Kineret (Amgen)	<i>E. coli</i>	2001
G-CSF	Neutropenia	Filgrastim (Hoffmann-La Roche)	<i>E. coli</i>	1994
G-CSF (glicosilado)	Neutropenia	Lenograstim (Rhône-Poulenc, Roer GmbH, Chugai)	Células CHO	1993
G-CSF (metionina N-terminal)	Neutropenia	Neupogen (Amgen)	<i>E. coli</i>	1991
PEG-Filgrastim	Neutropenia	Neulasta (Amgen Europe)	<i>E. coli</i>	2002
GM-CSF (glicosilado)	Neutropenia	Molgramostim (Essex Pharma GmbH, Sandoz AG, Schering-Plough)	Línea celular	1993
GM-CSF (difiere en la Leu 23)	Transplante autólogo de médula ósea	Leukine (ImmuneX)	<i>E. coli</i>	1991

Tabla 5. Inmunomoduladores de origen recombinante.

6. ¿Qué nos depara el futuro de la biotecnología en el campo de las proteínas recombinantes?

Gracias al desarrollo de la biotecnología y a los progresos científicos llevados a cabo en los últimos 50 años, un nuevo escenario de actuación ha surgido para el desarrollo del binomio formado por los nuevos fármacos y las nuevas dianas terapéuticas. Así, por ejemplo, se estima que el “Proyecto Genoma Humano” ha podido generar más de 10.000 dianas terapéuticas nuevas. Junto con esto, las tecnologías genómicas y proteómicas contribuirán a detectar los genes y proteínas que se expresan y producen de forma diferencial y específica en los distintos tejidos afectados por alguna patología, proporcionando una base científica para atacar de forma precisa la enfermedad. Una cosa que se está empezando a decir con vistas al futuro de la medicina es que con todas las herramientas proteómicas y genómicas de las que disponemos es que tratando personas y no enfermedades. Aunque los individuos de la especie humana se asemejen desde el punto de vista estrictamente genético en un 99%, enferman de forma distinta y responden a los tratamientos de forma distinta.

De modo que la idea que ronda en la cabeza de muchos es que es un completo error tratar por igual y con los mismos medicamentos a todos los pacientes que presentan una misma enfermedad. Hasta tal punto puede ser llevado esto con lo que conocemos como farmacogenética^{xxi}, de tal forma que la variabilidad genética determina la forma en que las personas absorben un fármaco determinado, de manera que no en todas funciona del mismo modo. Por lo tanto, cada vez se irá descartando en mayor medida ese planteamiento erróneo de usar lo mismo para todos. Cuanto más conocemos la respuesta de la genética a los medicamentos, ya sea esa respuesta positiva o negativa, más motivos tenemos para personalizar el tratamiento en cada paciente. Sin embargo, confiar únicamente en el análisis de secuencias sería insuficiente puesto que esto no tomaría en consideración todos los sistemas adaptativos multivariantes de los organismos vivos así como la integración con los factores de medio ambiente que inciden a lo largo de la vida de los individuos. Sin embargo, la nueva tecnología de *microarrays*, donde pueden analizarse miles de polimorfismos de un solo nucleótido, conjuntamente con los avances en el estudio de la ingeniería proteica (estructura y función) pueden dar una

lectura significativa de la susceptibilidad potencial de una patología así como su diagnóstico precoz, permitiendo una rápida intervención médica y el cambio en los hábitos para dificultar la aparición de la enfermedad. Médicos y pacientes serán los grandes beneficiarios del desarrollo de tales estudios. Se aprenderá mucho sobre la individualidad humana y de cómo estos progresos influirán en la salud individual y la susceptibilidad a la enfermedad.

Farmacogenética: esa variabilidad genética del individuo en la respuesta a los medicamentos constituye el estudio de la farmacogenética, un campo de la ciencia que se antoja cada vez más fundamental. En este contexto, los genes responsables del metabolismo de los medicamentos en el hígado tiene una especial relevancia, entre ellos los genes citocromo P450 (CYP). Según el neurocientífico Ramón Cacabelos^{xxii}, presidente del Centro Médico EuroEspes, de A Coruña, en función de los genes de esta familia de los que un individuo sea portador, podría clasificarse como metabolizador normal, intermedio, lento o rápido. Solamente el 25% de los españoles pertenece a la categoría de metabolizadores normales. En ellos el fármaco funciona tal como indica su prospecto y los resultados son los esperados. El 75% restante presenta alguna alteración genética que, por exceso o por defecto, provoca que el fármaco no resulte tan eficaz como se desea o que cause efectos indeseados. Resolver en parte este problema pasa por un mejor conocimiento del perfil genético de cada persona que permita elegir qué fármaco es más útil para cada cual. Una de las soluciones propuestas por EuroEspes y lanzada hace un par de años es la tarjeta farmacogenética digital, que contiene información farmacogenética del individuo, además de la relación de fármacos que puede utilizar y de aquellos que debería evitar. Con esa tarjeta, el propio usuario o el médico, insertándola en cualquier ordenador, puede acceder a la información del paciente, incluyendo historia clínica, informes médicos, imágenes, pruebas diagnósticas, perfil genómico y lista de fármacos que actúan como sustratos, inhibidores e inductores de las enzimas hepáticas responsables de su metabolización y eliminación.

Terapias personalizadas: esa variabilidad en el comportamiento de los medicamentos realza el interés creciente por los tratamientos personalizados o «a la carta». Así, el perfil genotípico y fenotípico de cada cual serán las claves del diagnóstico y el tratamiento individualizado, un panorama que vaticina importantes perspectivas hacia una mejor

asistencia. La oncología es el ámbito donde la personalización terapéutica más ha avanzado incidiendo en esa idea de nuevo de tratar personas y no enfermedades. Normalmente se llevaba a cabo el estadiaje clínico para determinar lo avanzado que estaba cada caso y ahora la idea es analizar los tumores y, en función de los resultados de ese análisis, decidirse por un fármaco u otro». Por ejemplo, se sabe que en el cáncer de pulmón no microcítico los portadores de una mutación en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se benefician de determinados fármacos, como el erlotinib o el gefitinib, los cuales no funcionan entre los no portadores de la mutación. «Hoy día este tipo de investigación es más factible que nunca. En un momento de crisis económica en el que se intenta que la cobertura sanitaria llegue a toda la población, lo más importante es priorizar recursos; y la medicina personalizada es una forma de ahorrar, además de evitar toxicidades y utilizar los tratamientos más efectivos de manera individualizada para cada paciente». Esta orientación se tiene en cuenta en el desarrollo de nuevos medicamentos y también es útil para recuperar otros que no hubieran resultado suficientemente exitosos, como es el caso de medicamentos que, cuando se ensayan, pueden no beneficiar a un extenso grupo de pacientes, pero pueden tener un efecto extraordinariamente positivo para un subgrupo de sujetos. Un ejemplo son determinados tipos de cánceres, en los que se sobreexpresa una determinada proteína. Para estos pacientes los datos de supervivencia son significativamente mejores y muy relevantes clínicamente». En este contexto, el desarrollo de biomarcadores, que permiten discriminar entre sujetos, es determinante no sólo para identificar adecuadamente los pacientes, minimizar las reacciones adversas o adaptar sus dosificaciones, sino también para ser más eficiente en el uso de los nuevos medicamentos.

En relación con todo esto tenemos una noticia aparecida en la prensa recientemente, un avance liderado por investigadores del Centro de Supercomputación de Barcelona que se ha publicado en la revista *Nature Biotechnology*^{xxiii}. La idea es posibilitar tratamientos más personalizados del cáncer y hacerlo de una manera más automatizada, todo ello basado en SMUFIN, un método computacional capaz de detectar alteraciones genéticas relacionadas con la aparición de tumores. El método compara el genoma de las células sanas del individuo con el de sus células tumorales, lo que permite identificar mutaciones en un tumor determinado, responsables de la aparición de la enfermedad. A su vez, con ese

conocimiento se podría determinar el tratamiento más adecuado para un tipo de cáncer concreto en un individuo concreto.

Terapia avanzada^{xxiv}: la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS) define como medicamentos de terapia avanzada aquellos que están basados en genes (terapia génica), células (terapia celular) o tejidos (ingeniería tisular) e incluyen productos de origen autólogo, alogénico o xenogénico. Para la Agencia, «constituyen nuevas estrategias terapéuticas y su desarrollo contribuirá a ofrecer oportunidades para algunas enfermedades que hasta el momento carecen de tratamientos eficaces». La Unión Europea creó un Comité de Terapias Avanzadas que ya ha evaluado algunos productos de terapia génica y algunos de terapia celular. De momento son pocos los que se han presentado a este comité, pero ya hay algunos aprobados. En el campo de la terapia génica se empezará pronto a recoger algunos frutos. Hace muchos años que se investiga en terapia génica pero todavía no tenemos ningún medicamento de este tipo en el mercado. En noviembre de 2012 la Comisión Europea aprobó el uso del primer fármaco comercial de terapia génica, el alipogene tiparvovec, diseñado para curar la deficiencia de la lipoproteína lipasa, mediante la infección del paciente con un virus que inserta en el organismo la versión correcta del gen, sustituyendo la versión alterada causante de la enfermedad. Se espera que se comercialice a finales de este año o principios del siguiente, aunque se trata de una enfermedad que afecta solamente a unos 200 pacientes en toda Europa. También la interferencia del ARN representa un campo prometedor, puesto que puede utilizarse para silenciar genes específicos y bloquear así la producción de proteínas asociadas a enfermedades. Es una línea de investigación de gran interés que está dando sus primeros pasos, entre ellos fármacos en diferentes fases de desarrollo clínico para la polineuropatía amiloidea familiar, hemofilia o la hepatitis B.

Nanotecnología^{xxv}: la manipulación de la materia a escala atómica o molecular tendrá importantes aplicaciones en el campo del diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades humanas. Una de las ideas con vistas al futuro que surgió es introducir en el torrente sanguíneo nanopartículas que se administran por vía oral y que monitorizan la sangre del individuo en

busca de biomarcadores diversos. Sus lecturas se recogen en un sensor que la persona lleva en la muñeca. Esas nanopartículas pueden identificar y adherirse a una célula tumoral, medir sustancias químicas en sangre o detectar una placa de ateroma a punto de desprenderse de la pared arterial y capaz de provocar una trombosis. Es casi ciencia-ficción y probablemente tardará años en llegar a la clínica. No obstante, es algo que ya se está investigando. Dentro de este concepto de nanotecnología, también se incluye la posibilidad de vehicular fármacos en partículas cuyo tamaño es muy inferior a las células de los mamíferos. Así, con estas tecnologías es de esperar múltiples ventajas tanto en el diagnóstico como en la terapéutica. La alta especificidad sobre los tejidos u órganos a tratar, con una baja toxicidad –objetivos comunes buscados desde los principios de la terapia farmacológica– se están viendo cristalizados de forma muy prometedora con la nanotecnología. En este aspecto, posiblemente veremos en un futuro muy próximo grandes avances en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. Actualmente ya se están utilizando fármacos muy específicos, pero con el desarrollo de nanopartículas y bionanocápsulas transportadoras se aumentará aún más esta especificidad. Se están desarrollando bionanocápsulas y nanorrobots que pueden marcar las células malignas para que otros fármacos actúen específicamente en ellas o actuando directamente por el transporte y liberación selectiva del fármaco en la célula diana. Posiblemente, con la introducción en la clínica de estas tecnologías ya no hablaremos de actuar sobre un "tejido diana" sino en la "célula diana". De esta forma, se puede deducir que su aplicabilidad no será sólo en el cáncer sino también en patologías autoinmunes, infecciosas, medicina regenerativa y otros ámbitos.

Acorto plazo no podemos esperar cambios demasiado significativos, de modo que la mayoría de los productos que se derivarán de la biotecnología serán extensiones reconocibles de los existentes o tendrán una base de mejora en la producción. Las pequeñas mejoras en los procesos por la aplicación de estas tecnologías nuevas no serán muy destacables pero ayudarán a las compañías productoras a aumentar la competitividad. Si bien existe hoy en día un amplio conocimiento y experiencia en procesos biológicos y de ingeniería esperando ser utilizados en procesos biotecnológicos productivos, su tasa de aplicación estará determinada, más que por cuestiones de tipo científico o tecnológico, por otro tipo de factores no menos importantes, tales como las políticas de inversión industrial, el

establecimiento de necesidades de mercado y la economía de las capacidades de “marketing” necesarias para introducir nuevos productos en el mercado y, por encima de todo, en como el público percibirá este nuevo grupo de tecnologías innovadoras. La biotecnología jugará un papel fundamental en la búsqueda de soluciones para los muchos problemas que afectarán a la sociedad del mañana, de salud, de suministro alimentario y medios ambientes biológicos seguros. La investigación científica continuada será clave para conseguir dichos logros.

7. Referencias y bibliografía.

Citas bibliográficas

- ⁱ WILKINS M, STOKES A, WILSON H. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature*. 1953;171(4356):738-740.
García J. Ingeniería genética y biotecnología [Internet]. *Analesranf.com*. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from:
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/535/553>
- ⁱⁱ García J. Ingeniería genética y biotecnología [Internet]. *Analesranf.com*. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from:
<http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/535/553>
- ⁱⁱⁱ Díaz Martínez V. Los colores de la biotecnología [Internet]. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia
- ^{iv} Zanlungo M, Silvana; ARRESE J, Marco y RIGOTTI R, Attilio. Medicina molecular: Presente y futuro (en inglés). *Rev. méd. Chile* [online]. 1999, vol.127, n.8 [citado 2010-01-05], pp. 982-988. ISSN 0034-9887. doi: 10.4067/S0034-98871999000800014.
- ^v Guevara- Hernández, E. and López-Zavala, A. (2017). *PERSPECTIVAS ACTUALES DEL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INDUSTRIAL*. [online] <http://www.biotechia.uson.mx>. Available at: <http://www.biotechia.uson.mx/revistas/articulos/24-Articulo%202.pdf> [Accessed 7 Jun. 2017].
- ^{vi} Espinosa, E. and Ramón, L. (2017). *Rituximab: historia, farmacología y perspectivas*. [online] *Bvs.sld.cu*. Available at: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol_26_3_10/hih02310.htm [Accessed 7 Jun. 2017].

vii Planelles, V. (2012). *Éxitos transgénicos: la insulina - Naukas*. [online] Naukas. Available at: <http://naukas.com/2012/01/05/exitos-transgenicos-la-insulina/> [Accessed 7 Jun. 2017].

viii Guerrero, M., Barrera, E. and Viader, J. (2004). *Biología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura*. [online] <http://www.uanl.mx>. Available at: http://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/23MarthaGuerrero.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].

ix Matilde Julián Seguí, M. (2017). *Estructura y propiedades de las proteínas*. [online] Available at: http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/trabajo_matilde.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].

x de Diego, T. (2008). *ESTABILIZACIÓN ENZIMÁTICA POR INGENIERÍA PROTEICA*. [online] <http://webs.um.es>. Available at: <http://webs.um.es/jalozate/lozanoteruel/ColaboracionesAmigas/Presentaciones/Ingenieria-Proteinas.pdf> [Accessed 7 Jun. 2017].

xi Mora, N. (2017). *Purificación de proteínas recombinantes (GFP)*. [online] Es.slideshare.net. Available at: <https://es.slideshare.net/nikolinoroll/purificacion-de-protenas-recombinantes-gfp> [Accessed 7 Jun. 2017].

xii Soberón Mainero, X. (2017). [online] Ingeniería de proteínas y evolución dirigida. Available at: http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/1038967/11_c07.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].

xiii Aranda A. Las hormonas. 1st ed. Madrid: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2015.

xiv Anticuerpos monoclonales de segunda generación [Internet]. Caibco.ucv.ve. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/SegGener.htm#Mol%C3%A9culas%20recombinantes%20derivadas%20de%20Ac>

xv García J. Ingeniería genética y biotecnología [Internet]. Analesranf.com. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/535/553>.

xvi Biotecnología [Internet]. Porquebiotecnologia.com.ar. [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&tipo=1¬e=71>

xvii García J. Ingeniería genética y biotecnología [Internet]. Analesranf.com. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/535/553>.

^{xviii} Albúmina de suero humana recombinante expresada grano del arroz para el cultivo celular primario [Internet]. Spanish.recombinantalbumin.com. [cited 7 June 2017]. Available from: <http://spanish.recombinantalbumin.com/sale-8750585-rice-grain-expressed-recombinant-human-serum-albumin-for-primary-cell-culture.html>

^{xix} Es.wikipedia.org. (2017). *Interferón*. [online] Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/Interferón#Formas_farmac.C3.A9uticas [Accessed 7 Jun. 2017].

^{xx} Azanza J. Lapegilación de fármacos [Internet]. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2012/05/v1n5a61pdf001.pdf>

^{xxi} El futuro de la biotecnología en la salud [Internet]. Amgen.es. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.amgen.es/profesionales/biotecnologia/salud>

^{xxii} Ramón Cacabelos: “Cualquier persona puede hoy saber qué fármacos y alimentos son buenos para su salud y cuáles no” [Internet]. DSaLud. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <https://www.dsalud.com/reportaje/ramon-cacabelos-cualquier-persona-puede-hoy-saber-que-farmacos-y-alimentos-son-buenos-para-su-salud-y-cuales-no/>

^{xxiii} Moncunill V, Gonzalez S, Beà S, Andrieux L, Salaverria I, Royo C et al. Comprehensive characterization of complex structural variations in cancer by directly comparing genome sequence reads. 2014.

^{xxiv} Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios [Internet]. <https://www.aemps.gob.es>. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp_TA.htm

^{xxv} M. Lechuga L. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud [Internet]. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf

Bibliografía

1. de Diego, T. (2008). *ESTABILIZACIÓN ENZIMÁTICA POR INGENIERÍA PROTEICA*. [online] <http://webs.um.es>. Available at: <http://webs.um.es/jalozate/lozanoteruel/ColaboracionesAmigas/Présentaciones/Ingenieria-Proteinas.pdf> [Accessed 7 Jun. 2017].
2. Dingermann, T. (2017). *Recombinant therapeutic proteins: Production platforms and challenges*. [online] <http://gauravrai.yolasite.com>. Available at: <http://gauravrai.yolasite.com/resources/Recombinant%20therapeu>

-
- tic%20proteins_Production%20platforms%20and%20challenges.PDF [Accessed 7 Jun. 2017].
3. Es.wikipedia.org. (2017). *Interferón*. [online] Available at: https://es.wikipedia.org/wiki/Interferón#Formas_farmacologicas [Accessed 7 Jun. 2017].
 4. Espinosa, E. and Ramón, L. (2017). *Rituximab: historia, farmacología y perspectivas*. [online] Bvs.sld.cu. Available at: http://www.bvs.sld.cu/revistas/hih/vol_26_3_10/hih02310.htm [Accessed 7 Jun. 2017].
 5. Guerrero, M., Barrera, E. and Viader, J. (2017). *Biología de proteínas recombinantes para la aplicación en acuicultura*. [online] <http://www.uanl.mx>. Available at: http://www.uanl.mx/utillerias/nutricion_acuicola/VII/archivos/23MarthaGuerrero.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].
 6. Guevara- Hernández, E. and López-Zavala, A. (2017). *PERSPECTIVAS ACTUALES DEL USO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y SU IMPORTANCIA EN LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA E INDUSTRIAL*. [online] <http://www.biotechia.uson.mx>. Available at: <http://www.biotechia.uson.mx/revistas/articulos/24-Articulo%202.pdf> [Accessed 7 Jun. 2017].
 7. <http://www.fmed.uba.ar>. (2017). *Tecnología del ADN recombinante y sus aplicaciones en la Medicina*. [online] Available at: <http://www.fmed.uba.ar/depto/bioqhum/Seminario%202017%20Biología%20Molecular.pdf> [Accessed 7 Jun. 2017].
 8. Matilde Julián Seguí, M. (2017). *Estructura y propiedades de las proteínas*. [online] Available at: http://www.uv.es/tunon/pdf_doc/trabajo_matilde.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].
 9. Mora, N. (2017). *Purificación de proteínas recombinantes (GFP)*. [online] Es.slideshare.net. Available at: <https://es.slideshare.net/nikolinoroll/purificacion-de-protenas-recombinantes-gfp> [Accessed 7 Jun. 2017].

-
10. Muhammad Sajid Hamid, A. (2015). *Development of therapeutic proteins: advances and challenges*. [online] <http://journals.tubitak.gov.tr>. Available at: <http://journals.tubitak.gov.tr/havuz/biy-1411-8.pdf> [Accessed 7 Jun. 2017].
 11. Planelles, V. (2017). *Éxitos transgénicos: la insulina - Naukas*. [online] Naukas. Available at: <http://naukas.com/2012/01/05/exitos-transgenicos-la-insulina/> [Accessed 7 Jun. 2017].
 12. Porquebiotecnologia.com.ar. (n.d.). *Biotecnología*. [online] Available at: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=49> [Accessed 7 Jun. 2017].
 13. prezi.com. (2017). *PROTEINAS TERAPEUTICAS*. [online] Available at: <https://prezi.com/n0r4gv4nwtj6/proteinas-terapeuticas/> [Accessed 7 Jun. 2017].
 14. Rueda, P. (2017). *Proteínas recombinantes, ¿cómo y para qué? VLPs: un ejemplo interesante*. [online] Sebbm.es. Available at: <http://www.sebbm.es/web/es/divulgacion/rincon-profesor-ciencias/articulos-divulgacion-cientifica/332-proteinas-recombinantes-como-y-para-que-vlps-un-ejemplo-interesante> [Accessed 7 Jun. 2017].
 15. Soberón Mainero, X. (2017). [online] Ingeniería de proteínas y evolución dirigida. Available at: http://fenix.cichcu.unam.mx/libroe_2006/1038967/11_c07.pdf [Accessed 7 Jun. 2017].
 16. Trujillo, M. (2017). *Un Acercamiento a La Producción De Proteínas Recombinantes Terapéuticas De Uso Humano*. [online] Academia.edu. Available at: http://www.academia.edu/464986/Un_Acercamiento_a_La_Produccion_De_Proteinas_Recombinantes_Terapeuticas_De_Uso_Humano [Accessed 7 Jun. 2017].

-
17. Vázquez, G. (2017). *La biotecnología como estrategia terapéutica - ScienceDirect*. [online] Scencedirect.com. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0120563316301334> [Accessed 7 Jun. 2017].
 18. WILKINS M, STOKES A, WILSON H. Molecular Structure of Nucleic Acids: Molecular Structure of Deoxypentose Nucleic Acids. *Nature*. 1953;171(4356):738-740.
 19. Biotecnología [Internet]. Porquebiotecnologia.com.ar. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=49>
 20. García J. Ingeniería genética y biotecnología [Internet]. Analesranf.com. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/535/553>
 21. Díaz Martínez V. Los colores de la biotecnología [Internet]. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: https://biotechspain.com/es/tema.cfm?iid=colores_biotecnologia
 22. Aranda A. *Las hormonas*. 1st ed. Madrid: Editorial CSIC Consejo Superior de Investigaciones Científicas; 2015.
 23. Anticuerpos monoclonales de segunda generación [Internet]. Caibco.ucv.ve. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/SegGener.htm#Mol%C3%A9culas%20recombinantes%20derivadas%20de%20Ac>
 24. Biotecnología [Internet]. Porquebiotecnologia.com.ar. [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&tipo=1¬e=71>
 25. Albúmina de suero humana recombinante expresada grano del arroz para el cultivo celular primario [Internet]. Spanish.recombinantalbumin.com. [cited 7 June 2017]. Available

from: <http://spanish.recombinantalbumin.com/sale-8750585-rice-grain-expressed-recombinant-human-serum-albumin-for-primary-cell-culture.html>

26. Azanza J. Lapegilación de fármacos [Internet]. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://aeeh.es/wp-content/uploads/2012/05/v1n5a61pdf001.pdf>
27. Moncunill V, Gonzalez S, Beà S, Andrieux L, Salaverria I, Royo C et al. Comprehensive characterization of complex structural variations in cancer by directly comparing genome sequence reads. 2014.
28. Ramón Cacabelos: “Cualquier persona puede hoy saber qué fármacos y alimentos son buenos para su salud y cuáles no” [Internet]. DSalud. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <https://www.dsalud.com/reportaje/ramon-cacabelos-cualquier-persona-puede-hoy-saber-que-farmacos-y-alimentos-son-buenos-para-su-salud-y-cuales-no/>
29. El futuro de la biotecnología en la salud [Internet]. Amgen.es. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: <http://www.amgen.es/profesionales/biotecnologia/salud>
30. Agencia Española de Medicamentos y Productos sanitarios [Internet]. <https://www.aemps.gob.es>. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: https://www.aemps.gob.es/investigacionClinica/terapiasAvanzadas/preg-resp_TA.htm
31. M. Lechuga L. Nanomedicina: aplicación de la nanotecnología en la salud [Internet]. 2017 [cited 7 June 2017]. Available from: http://digital.csic.es/bitstream/10261/44635/1/7_Nanomedicina.pdf