



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

Diseño y optimización de proteínas terapéuticas

Design and optimization of therapeutic proteins

**Autor/a:** D. Ismael Fernández Cisneros

**Director/es:** D. Gabriel Moncalián Montes

**Santander, Junio 2021**

## Resumen:

En la actualidad las proteínas terapéuticas son fármacos fundamentales que nos han permitido mejorar el tratamiento de un gran número de patologías, el desarrollo de la ingeniería genética y el gran número de dianas terapéuticas que se han descubierto desde la secuenciación del genoma humano, hacen de las proteínas terapéuticas una posible solución a patologías graves.

En este trabajo se expone una revisión sobre la ingeniería genética en especial la técnica de ADN recombinante, los sistemas de expresión más comúnmente empleados y su utilización en los distintos procesos de mutagénesis tanto sitio-específica como aleatorizada, phage display o el hibridoma. Además, se estudia mediante que procesos de ingeniería genética se generan las proteínas terapéuticas más relevantes, la insulina o el adalimumab, tanto clínicamente como económicamente y las distintas patologías en las que está indicada su utilización.

Es decir, es un trabajo que desarrolla los conceptos fundamentales para entender cómo se diseñan, se optimizan y generan las distintas proteínas terapéuticas y sus posibles utilidades.

**Palabras clave:** ADN recombinante, proteínas terapéuticas, sistemas de expresión, insulina, anticuerpos recombinantes.

## Abstract:

At present, therapeutic proteins are fundamental drugs that have allowed us to improve the treatment of many pathologies. The development of genetic engineering and the large number of therapeutic targets that have been discovered thanks to the sequencing of the human genome, make therapeutic proteins a possible solution to serious pathologies.

This work presents a review on genetic engineering, especially on the recombinant DNA technique, the most commonly used expression systems and their use in different processes, such as site-specific and randomized mutagenesis, phage display or hybridoma. In addition, it is studied by means of which genetic engineering processes the most clinically and economically relevant therapeutic proteins are generated, insulin or adalimumab and the different pathologies in which their use is indicated. In other words, it is a work that develops the fundamental concepts to understand how the different therapeutic proteins and their possible utilities are designed, optimized and generated.

**Key words:** Recombinant DNA, Therapeutic proteins, expression systems, insulin, recombinant antibodies.

## Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico  
FDA: administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos  
CIMA: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios  
EMA: Agencia Europea de Medicamentos  
E. coli: Escherichia coli  
CHO: línea celular de ovario de hámster chino  
NSO: línea celular del Mieloma del ratón  
BHK: línea celular de riñón de hámster bebé  
*HEK293*: células de riñón de embrión humano  
DM: diabetes Mellitus  
Da: Daltons  
kDa: Kilodaltons  
GH: hormona del crecimiento  
rhGH. hormona del crecimiento humana recombinante  
SHOX: short Stature Homeobox  
mAbs: Anticuerpos monoclonales  
Cadena L: cadena ligera  
V<sub>L</sub>: dominio variable  
C<sub>L</sub>: dominio constante  
Cadena H: cadena pesada  
V<sub>H</sub>: dominio variable  
C<sub>H</sub>: dominio constante  
HGPRT: gen de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa  
Medio HAT: medio hipoxantina-aminopterin-timidina  
CDR: región determinante de la complementariedad)  
IgG: inmunoglobulina G  
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular  
VEGFR: receptores del factor de crecimiento endotelial vascular  
EGFR: receptor del factor de crecimiento epidérmico  
CAT: Cambridge Antibody Technology  
TNF- $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos  
IL: interleuquina  
AR: Artritis reumatoide  
FARMEs: fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad  
CFTR: gen regulador de la conductibilidad transmembrana  
ADNasa I: enzima humana desoxirribonucleasa I  
IFN: interferón

# Índice

|                                                               |           |
|---------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. Introducción</b> .....                                  | <b>4</b>  |
| <b>1.a. Biotecnología</b> .....                               | <b>4</b>  |
| <b>1.b. ADN recombinante</b> .....                            | <b>5</b>  |
| <b>1.c. Historia de las proteínas terapéuticas</b> .....      | <b>6</b>  |
| <b>2. Producción y diseño de proteínas terapéuticas</b> ..... | <b>8</b>  |
| <b>2.a. Sistemas de expresión</b> .....                       | <b>8</b>  |
| <i>Células de mamíferos</i> .....                             | 9         |
| <i>E. Coli</i> .....                                          | 9         |
| <i>Levaduras</i> .....                                        | 10        |
| <b>2.b. Optimización de las proteínas terapéuticas</b> .....  | <b>10</b> |
| Mutagenesis sitio-específica .....                            | 10        |
| Mutagénesis aleatorizada .....                                | 11        |
| Phage display.....                                            | 13        |
| <b>3. Proteínas terapéuticas</b> .....                        | <b>16</b> |
| <b>3.a. Hormonas</b> .....                                    | <b>16</b> |
| Insulina .....                                                | 16        |
| Somatotropina o rhGH.....                                     | 18        |
| <b>3.b. Anticuerpos recombinantes</b> .....                   | <b>18</b> |
| Bevacizumab .....                                             | 21        |
| Adalimumab .....                                              | 22        |
| <b>3.c. Enzimas</b> .....                                     | <b>24</b> |
| Dornasa alfa Pulmozyme® (ADNasa I) .....                      | 24        |
| <b>3.d. Interferón y otros inmunomoduladores</b> .....        | <b>25</b> |
| <b>3.e. Factores de coagulación</b> .....                     | <b>25</b> |
| <b>4. Perspectivas de futuro</b> .....                        | <b>27</b> |
| <b>REFERENCIAS</b> .....                                      | <b>29</b> |

# 1. Introducción

## 1.a. Biotecnología

Para abordar de lleno el tema de las proteínas terapéuticas debemos empezar por las bases fundamentales. Lo primero que debemos saber es ¿qué es y para qué sirve la biotecnología?

La biotecnología es la utilización de organismos vivos, mayoritariamente bacterias (*E. coli*), levaduras y hongos (*Saccharomyces cerevisiae*), para crear o modificar productos con fines prácticos o industriales específicos. Dichos organismos pueden estar o no modificados genéticamente por lo que no hay que confundir la Biotecnología con la ingeniería genética.

Estos procesos se pueden emplear en campos muy variados, desde la alimentación, agricultura, ganadería, medio ambiente o medicina. Observamos como la biotecnología tiene un sinnúmero de utilidades, este gran número de aplicaciones ha obligado a agruparlas en los llamados colores de la biotecnología<sup>1</sup>, que son los siguientes:

- Verde (agroalimentaria): Busca obtener vegetales más nutritivos y productivos mediante transgénicos.
- Azul (marina): Es bastante reciente y consiste en utilizar la biología marina y de agua dulce para la obtención de alimentos, medicamentos, cosméticos, biocombustibles y acuicultura.
- Roja (biomedicina): Utilizada para el diseño y producción de nuevas vacunas, creación de proteínas terapéuticas (tema principal de este trabajo), terapia génica y de células madre.
- Blanca (energética e industrial): Procesos industriales a gran escala como la producción en masa de medicamentos, vacunas o del desarrollo de nuevas energías como puede ser el biodiésel.
- Gris (medioambiental): Trabaja en preservar el medio natural evitando o solucionando problemas ecológicos, el análisis genético de poblaciones y especies del ecosistema.

Este campo está en continuo avance por lo que se van desarrollando nuevos colores como el amarillo (nutricional), el negro (contra el bioterrorismo) o el marrón (tratamiento y aprovechamiento de suelos áridos y desérticos).

La llamada biotecnología tradicional utilizaba mayoritariamente esta ciencia en los sectores farmacéuticos y agroalimentarios. En 1973 se publicó el primer experimento que utilizó técnicas básicas para modificar y transferir genes de un organismo a otro, es decir, ingeniería genética. En 1982 culmina con la aprobación y comercialización de la insulina humana recombinante (Humilin®), con lo que en apenas una década se sentaron bases de la **ingeniería genética**<sup>2</sup>. Tras la aprobación de Humilin® empieza el periodo de la llamada biotecnología moderna, en el cual se empiezan a utilizar las técnicas de ingeniería genética. Esto nos permite, entre otras aplicaciones, la producción de proteínas terapéuticas, que nos ayudaran a tratar de forma más eficaz distintas patologías, lo cual ha supuesto un gran avance para la sanidad y para la calidad de vida de las personas con patologías tratables mediante proteínas terapéuticas.

Para entender cómo se producen y diseñan estas proteínas terapéuticas, debemos hablar sobre el ADN recombinante. Y para poder entender en que consiste antes debemos explicar la historia del estudio del genoma y del ADN.

## 1.b. ADN recombinante

En el siglo XX se hacen grandes avances en la biología, lo cual será a día de hoy la base de la biotecnología. El nombre de biotecnología fue usado por primera vez en 1917 por Karl Ereky, pero hasta los 70s no era aceptada como una disciplina científica<sup>3</sup>. Sobretudo hay un gran avance que es el descubrimiento de la estructura doble hélice del ADN; publicado en Nature en abril de 1953. En este artículo se establecen 4 características incuestionables: El ADN está formado por dos cadenas, antiparalelas, complementarias y se conforman en doble hélice. Por este descubrimiento James Watson, Francis Crick y Frederick Wilkins obtuvieron el premio nobel de medicina o fisiología en 1962.

Este avance nos ayudó a entender como el ADN posee la información genética y como se transmite de generación en generación. Anteriormente en 1950 Erwin Chargaff analizó las bases nitrogenadas del ADN en diferentes formas de vida, concluyendo que, la cantidad de purinas (adenina y guanina) siempre se encontraban en proporciones iguales a las de las pirimidinas (citosina y timina). La proporción era igual en todas las células de los individuos de una misma especie, pero variaba de una especie a otra. El otro gran avance fue el proyecto genoma humano cuyo principal objetivo era la determinación de la secuencia de pares de bases que componen el ADN y así poder mapear el genoma humano. Este proyecto fue un proyecto internacional que se inició en 1990 y finalizó la secuenciación del genoma en 2003.<sup>4</sup>

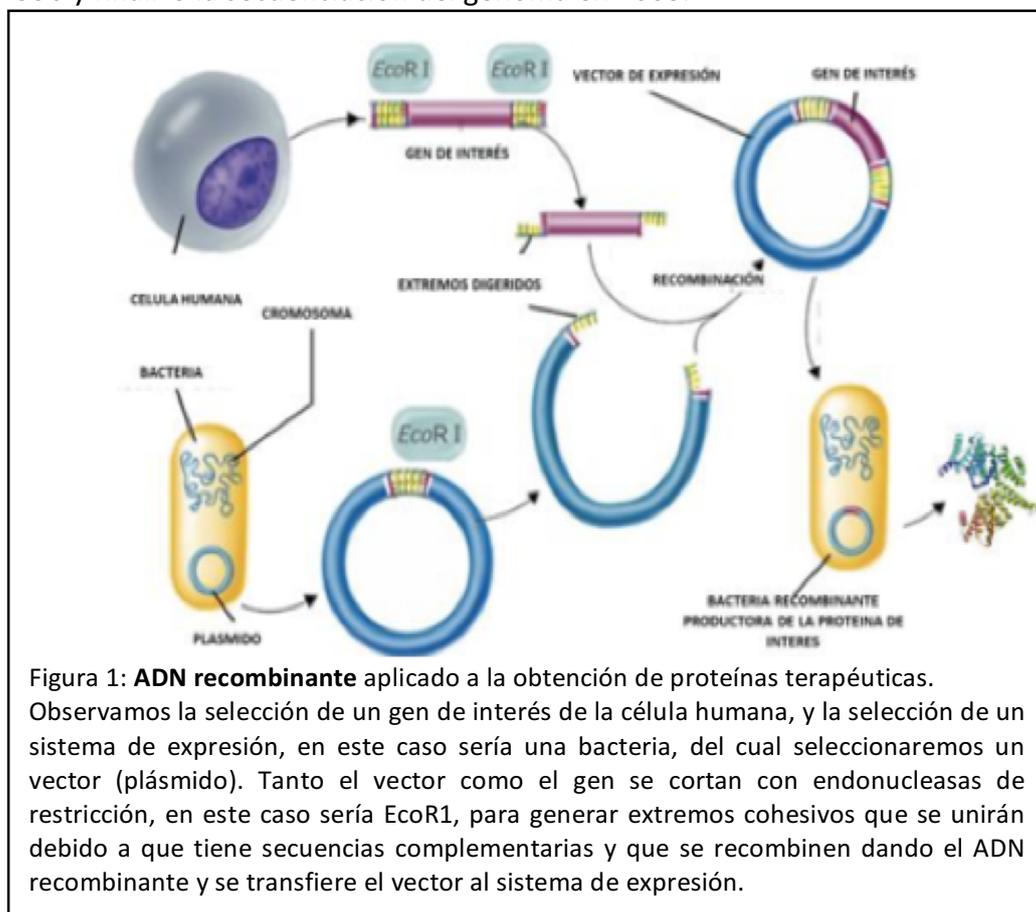


Figura 1: **ADN recombinante** aplicado a la obtención de proteínas terapéuticas. Observamos la selección de un gen de interés de la célula humana, y la selección de un sistema de expresión, en este caso sería una bacteria, del cual seleccionaremos un vector (plásmido). Tanto el vector como el gen se cortan con endonucleasas de restricción, en este caso sería EcoRI, para generar extremos cohesivos que se unirán debido a que tiene secuencias complementarias y que se recombinen dando el ADN recombinante y se transfiere el vector al sistema de expresión.

Los avances en el conocimiento de la estructura y la función del ADN han permitido el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante.

El **ADN recombinante** es una molécula creada de forma sintética mediante la elección de un gen o un lugar concreto del ADN de un organismo, que se aísla, se analiza y si es necesario se modifica y una vez realizado este proceso se inserta en una célula, bacteriana o a una levadura (en la mayoría de ocasiones), que copiarán este ADN modificado al mismo tiempo que copian el suyo propio y se expresará con normalidad (Figura 1). Este proceso es conocido como clonación de ADN y da lugar a un ADN clonado también llamado ADN recombinante<sup>5</sup>. La primera tecnología de ADN recombinante fue creada por Boyer y Cohen en 1973<sup>6</sup> y por la empresa Genetech en 1978. Los objetivos de la técnica del ADN recombinante son:

1. Obtener grandes cantidades del producto del gen.
2. Conocer las consecuencias en el funcionamiento celular si modificas una zona determinada de un gen
3. Sustituir un gen defectuoso por uno con una funcionalidad normal.

Esta técnica nos ha permitido avanzar en distintos campos, pero el que más nos concierne en este trabajo es el de la medicina, ya que ha proporcionado nuevos métodos diagnósticos, revelado mecanismos patogénicos de diversas patologías y creado nuevos agentes terapéuticos, como son las proteínas recombinantes.<sup>7</sup>

### 1.c. Historia de las proteínas terapéuticas

Las proteínas recombinantes son aquellas que se obtienen al expresar un gen clonado o un ADN modificado en una línea celular o especie distinta a la original.

Estas proteínas tienen una historia muy reciente, ya que en 1982 fue aprobada por primera vez por la FDA Humulin®, que es una insulina humana recombinante para el tratamiento de la diabetes mellitus y en 1986 se aprobó Muromonab-CD3, fue el primer anticuerpo monoclonal aprobado por la FDA<sup>8</sup>. Pero a pesar de su corta historia ha tenido un desarrollo exponencial ya que a día de hoy existen más 150 biofármacos en el mercado y más de 400 se encuentran en ensayos clínicos<sup>9</sup>. También tenemos que tener en cuenta que es un sector que no para de evolucionar y producir nuevas terapias para distintas patologías, y esto se debe a que de cara a la industria el desarrollo de proteínas terapéuticas tiene una gran rentabilidad, como podemos observar en la figura 2. Según este estudio el fármaco que más facturó en 2017 fue Humira® (Adalimumab), aunque la patente ya ha vencido por lo que hay una lucha por la creación de los biosimilares. Este es un gran ejemplo de anticuerpo monoclonal que, al haber vencido su patente permite al sistema nacional de salud de España ahorrar millones de euros. Se calcula que el sistema nacional de salud de España se ahorró aproximadamente 2.000 millones de euros entre 2009-2019 con la compra de biosimilares<sup>10</sup>.

Más adelante explicaremos distintas proteínas terapéuticas y como se producen. Ahora nos centraremos en los distintos sistemas de expresión y las distintas formas de diseño de las proteínas recombinantes.

| Datos en millones de euros |                   |                                          |             | Facturación del medicamento |                |
|----------------------------|-------------------|------------------------------------------|-------------|-----------------------------|----------------|
| LABORATORIO                | Facturación total | MEDICAMENTO ORIGINAL<br>Principio activo | PATOLOGÍA   | En EE UU                    | Fuera de EE UU |
| J&J                        | 70.208            | Remicade Infiximab                       | Inmunología | 3.464                       | -              |
|                            |                   | Rituxan Rituximab                        | Inmunología | 3.575                       | 2.514          |
| Roche                      | 49.400            | Herceptin Trastuzumab                    | Oncología   | 2.426                       | 3.728          |
|                            |                   | Avastin Bevacizumab                      | Oncología   | 2.426                       | 2.774          |
| Pfizer                     | 45.938            | Enbrel Etanercept                        | Inmunología | -                           | 1.127          |
| Merck                      | 35.537            | Remicade Infiximab                       | Inmunología | -                           | 606            |
| Sanofi                     | 34.666            | Lantus Insulina glargina                 | Diabetes    | 1.744                       | 1.744          |
| AbbVie                     | 26.003            | Humira Adalimumab                        | Inmunología | 11.259                      | 5.549          |
| Eli Lilly                  | 20.800            | Humalog Insulina lispro                  | Diabetes    | 1.559                       | 1.040          |
| AMGEN                      | 19.934            | Enbrel Etanercept                        | Inmunología | 4.360                       | -              |
|                            |                   | Neulasta Pegfilgrastim                   | Oncología   | 3.378                       | 520            |
|                            |                   | Epogen Epoetina alfa                     | Oncología   | 866                         | -              |

Figura 2: **Facturación de biosimilares en 2017**

Humalog®, Enbrel® o Lantus® son proteínas producidas mediante ingeniería genética y Rituximab, Infiximab, Trastuzumab, Bevacizumab y Adalimumab son anticuerpos monoclonales.

## 2. Producción y diseño de proteínas terapéuticas

### 2.a. Sistemas de expresión

En este subapartado vamos a comentar los principales sistemas de expresión que se utilizan para la producción de proteínas terapéuticas.

Las proteínas terapéuticas se fabrican en distintos tipos de organismos hospedadores. El resumen de cómo se obtiene una proteína recombinante sería básicamente: Obtener el material que codifica la proteína, construir un vector (molécula que transfiere y replican fragmentos de ADN insertados mediante la técnica de ADN recombinante) adaptado al organismo hospedador y que se exprese la proteína que nos interesa en el organismo recombinante.

Los sistemas de expresión más usados son la bacteria *Escherichia coli*, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y las células de mamífero *Chinese Hamster Ovary* (CHO). La elección del organismo hospedador para producción una proteína terapéutica está guiada por varios criterios:

1. La aplicación final del producto
2. La complejidad del producto
3. La necesidad de cumplir los requisitos de calidad
4. La productividad
5. El rendimiento económico
6. La tecnología de cultivo que poseas

En la siguiente tabla se exponen las distintas ventajas y desventajas que tiene cada uno de estos 3 sistemas de expresión, me centro en estos sistemas porque se produce el 93% de las proteínas terapéuticas (56% en *Líneas celulares de mamíferos (CHO)*, 24% en *E.coli* y 13% en *levaduras*)<sup>11</sup>.

| Sistema de expresión        | Ventajas                                                                                                                 | Desventajas                                                                                                                                                                            | Ejemplos de Proteínas terapéuticas.                                                                              |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Bacterias ( <i>E.coli</i> ) | Gran variedad de vectores de expresión y cepas mutantes<br>Fácil manejabilidad<br>Alta productividad<br>Cultivos baratos | Sin modificaciones post-transduccionales.<br>Insuficiente secreción proteica al medio de cultivo.<br>Posibles contaminaciones con endotoxinas perjudiciales.<br>Purificación compleja. | Humulin <sup>®</sup> , Humalog <sup>®</sup> , Lantus <sup>®</sup> , IFN-β1b, α2a/2b e γ1b humanos recombinantes. |

|                                                 |                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                              |                                          |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Levadura<br>( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) | Manipulación sencilla.<br>Variedad de vectores de expresión y modificación.<br>Realiza modificaciones post-transduccionales simples.<br>Muy alta productividad. | Produce hiperglicosilaciones.<br>Muy difícil la expresión de proteínas muy complejas (Anticuerpos monoclonales).<br>Necesitan sistemas de cultivo avanzado para obtener un alto rendimiento. | Albumina humana.<br>Transferrina humana. |
| Células de mamífero ( <i>CHO</i> )              | Modificaciones post-transduccionales complejas.<br>Secreción de proteínas al medio celular.<br>Variedad sistema de expresión y modificación.                    | Compleja obtención de cepas altamente productivas.<br>Medio de cultivo caro.<br>Técnicas de cultivo complejas.<br>Baja productividad                                                         | IFN-β1a humano recombinante Recombinate® |

- **Células de mamíferos**<sup>12</sup>: la más utilizada es la CHO (70%), aunque hay otras como *NSO* (originada en la línea celular del Mieloma del ratón) o *BHK* (riñón de hámster bebé). Esta línea celular se utiliza debido a que muchas proteínas son extremadamente complejas para que puedan ser producidas en un sistema procariota o en uno eucariota unicelular (levaduras). Ya que la producción de estas proteínas, por ejemplo; los anticuerpos monoclonales, necesitan una maquinaria compleja que sea capaz de producir modificaciones post-transduccionales como la glicosilación que los otros sistemas no pueden realizar de forma correcta, además está descrito que estas modificaciones son muy influyentes en la calidad y la eficacia de la proteína. Los sistemas procariotas darían células aglicosiladas que suelen ser inactivas y además son rápidamente eliminadas. Sin embargo, los sistemas eucariotas (levaduras) si pueden producir glicosilaciones, pero suelen ser distintas a las humanas, además pueden dar hiperglicosilaciones lo cual produciría que el paciente tratado tuviese una respuesta del sistema inmune contra la proteína recombinante. Por todo lo expuesto anteriormente las células de mamífero son los sistemas de expresión de elección para la producción de las proteínas complejas.
- **E. Coli**<sup>13</sup> fue el primer organismo utilizado para la creación de una proteína terapéutica, el Humulin®, ¿por qué aún sigue siendo tan utilizado? Esto se debe a que existe un desarrollo importante de herramientas para la modificación de este organismo y que posee una relativa sencillez a la hora de manejarlo y tiene una gran productividad lo cual es una importante ventaja. Estos tres son los

principales puntos por los que aún sigue siendo el huésped de elección para producir de proteínas recombinantes simples.

- **Levaduras**<sup>14</sup>: Su utilización es menor que la de los 2 sistemas de expresión anteriores. Una de sus limitaciones más importantes es que realiza una N-glicosilación con alto contenido de manosa. Esto confiere una vida media corta de la proteína modificada in vivo, que luego puede tener una eficacia reducida para uso terapéutico.

## 2.b. Optimización de las proteínas terapéuticas

En este apartado vamos a tratar como se pueden producir proteínas terapéuticas mediante ingeniería proteica de distintos métodos, hay principalmente dos que son por mutagenesis sitio- específica o aleatorizada.

Lo primero es explicar a que llamamos ingeniería proteica, es un método de creación artificial de nuevas proteínas que añadan nuevas funciones a las proteínas humanas originales, como enzimas y anticuerpos, las cuales juegan un papel importante en nuestra fisiología o en la mejora de la función proteica.

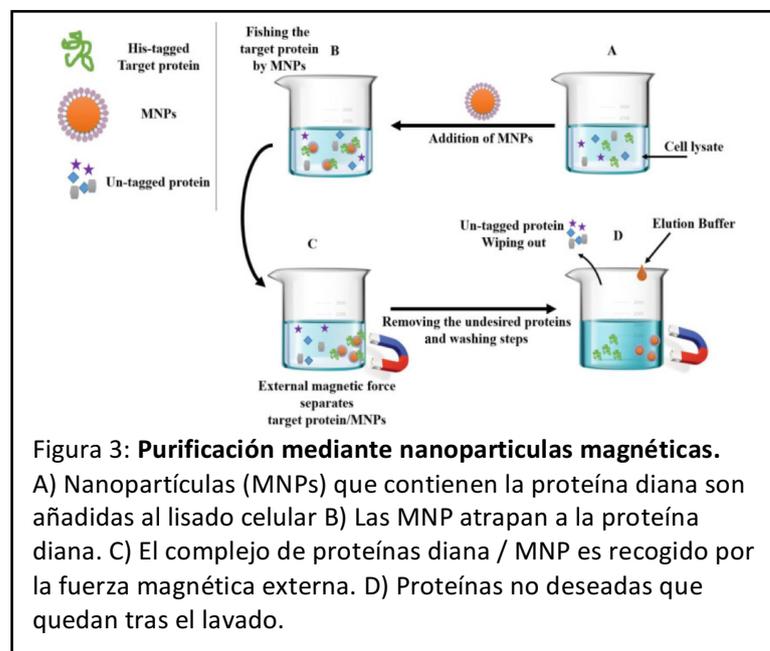
La optimización de las proteínas terapéuticas se puede realizar mediante: la mutagenesis directa, la aleatorizada la cual engloba el phage display y el diseño semirracional. Por el estudio de estos procesos otorgaron en 2018 el premio nobel de química a George P Smith and Sir Gregory P Winter por el desarrollo "The phage display of peptides and antibodies" y a Frances H Arnold por el desarrollo "the directed evolution of enzymes".

**Mutagenesis sitio-específica o diseño racional:** La definiríamos como la sustitución de un pequeño número de residuos en una secuencia de proteínas por aquellas que tienen las propiedades físico-químicas o espaciales deseadas. Y esto se consigue siguiendo unos pasos:

- Un **Análisis estructural** de la proteína que queremos modificar, esto se realiza mediante técnicas de difracción de rayos x o resonancia magnética nuclear, los cuales nos darían la estructura terciaria de la proteína y con ello su función y su estabilidad. Aunque a día de hoy existe vía online un banco de datos de proteínas ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) en el cual hay un gran número de estructuras macromoleculares.
- **Diseño y predicción:** En el **diseño** debemos conseguir una proteína mutante termoestable que realice la función deseada en condiciones de temperatura, pH, presión, oxidación cambiante y que no se desnaturalice. Esto lo conseguiremos mediante la ingeniería proteica ya que es la que modelará las propiedades de la proteína al determinar que aminoácidos deben cambiarse para lograr una propiedad específica. La **predicción** se realiza mediante bioinformática, es decir utilizando programas específicos para la visualización y manipulación de la proteína nativa, con ello podremos interpretar y predecir cómo influyen las mutaciones en el plegamiento y en las propiedades de la proteína.
- **Mutagénesis sitio-específica:** Es el proceso en el que se generan cambios en la codificación de aminoácidos a nivel del ADN. Por lo que se convierte en un proceso de prueba error en el que se realizan cambios en los nucleótidos que en

la fase de diseño se seleccionaron ya que tenían una mayor probabilidad de producir un cambio particular en una propiedad de la proteína. Después, la proteína codificada por cada gen mutado debe probarse para determinar si el proceso de mutagénesis ha generado realmente el cambio deseado.<sup>3</sup>

- La **purificación** de proteínas es un paso esencial del procesamiento de las proteínas recombinantes, el cual puede llegar a costar la mitad del presupuesto total del proceso. Es importante para los campos de alto rendimiento que están emergiendo entre ellos la creación de fármacos. Por lo tanto, el desarrollo de métodos rápidos y eficientes de purificación de proteínas es uno de los pasos más importantes. Además, las purificaciones deben cumplir con requisitos de alto rendimiento, alta pureza y alta actividad. Por lo tanto, es necesario tener un sistema de purificación eficiente para cumplir con los requisitos necesarios.<sup>15</sup> Existen múltiples procesos de purificación proteínas, una de ellas es mediante nanopartículas magnéticas, explicado en la figura 3.<sup>16</sup>



- **Función y conformación:** este es el último paso, en el cual debemos comprobar, una vez realizada la mutagénesis y la purificación, que la proteína recombinante creada posee las funciones para la que la hemos diseñado.

La gran ventaja de la mutagénesis sitio-específica es que hay una mayor probabilidad de mutaciones beneficiosas al haber podido diseñar el cambio y cómo afectaría ello a las propiedades de la proteína.

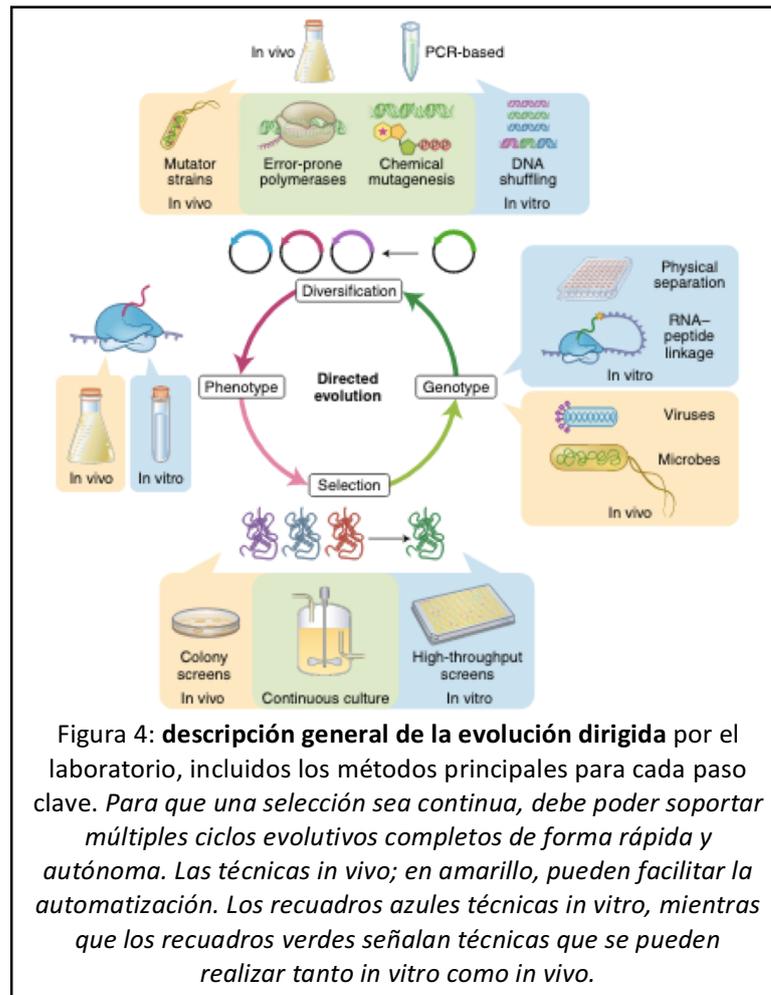
Otro método es el denominado **mutagénesis aleatorizada** o **evolución dirigida**<sup>17</sup>. El cual consiste en varios pasos; lo primero es someter un gen a **rondas repetitivas de mutagénesis** (creando una biblioteca de variantes), después hay que **detectar las mutaciones con una actividad disminuida**, la **selección** (expresando las variantes y seleccionando las que poseen la función deseada) y la **amplificación** (generando una plantilla para la siguiente ronda). Y este procedimiento puede realizarse *in vivo* o *in vitro*.

- **Generación de variantes:** Este es el primer paso en el cual se debe crear una biblioteca de genes mutados, es decir una diversificación. Estos genes mutados se pueden conseguir mediante técnicas *in vivo* (cepas mutantes), *in vitro* (ADN shuffling) y existen otros métodos que se podrían realizar tanto *in vivo* como *in vitro* y estos procesos pueden llegar a crear millones de secuencias para una proteína con 100 aminoácidos.
- **Detección de mutaciones no válidas:** En esta fase debemos detectar las variantes con una peor actividad. Esto se realiza mediante ensayos de alto rendimiento. Existen 2 métodos principales:
  - Sistemas de selección: En el cual se estudiará directamente como se acopla la función de la proteína a la supervivencia del gen.
  - Sistemas de cribado: El cual analiza cada variante y establece un umbral con lo que se podrá cribar según la actividad deseada.

Ambos métodos se pueden realizar *in vivo* o *in vitro*<sup>18</sup>.

- *In vivo*: cada célula del sistema de expresión contiene una variante distinta, por lo que solo difiere un gen entre las células. Las células expresan en su citoplasma o en la superficie la proteína mutada y así podremos probar la función. La ventaja de seleccionar propiedades en un entorno celular, es que es más útil cuando se va a utilizar en organismos vivos.
  - *In vitro*: Implica que los procesos de traducción y transcripción se deben hacer *in vitro*, que pueden expresar proteínas que serían tóxicas para las células. La ventaja de hacer el procedimiento *in vitro* es que se amolda mejor a las condiciones de temperatura, disolución... y además crea bibliotecas mucho mayores.
- **Selección:** Esta fase es en la cual escogeremos las proteínas que realicen las funciones para lo que fueron diseñadas y desecharemos las deficientes. Se puede realizar básicamente de 3 modos: screening de colonias (*in vivo*), métodos de alto rendimiento (*in vitro*) y mediante un cultivo continuo.
  - **Amplificación:** Las secuencias de genes aisladas se han de amplificar mediante PCR o bacterias hospedadoras y se usará la mejor secuencia individual o un conjunto de secuencias como base para repetir la mutagénesis, con lo que conseguiremos que se generen proteínas con una mejor adaptación y funcionalidad, por eso es necesario repetir el ciclo de diversificación-selección-amplificación.

Las fases explicadas anteriormente se pueden realizar mediante mutagénesis aleatorizada (figura 4), en la cual al menos uno de estos pasos lo ha de realizar manualmente el investigador, lo que provoca una inversión de tiempo mayor y una mayor duración del proceso. O mediante la mutagénesis aleatorizada continua, que, por el contrario, automatiza todos los pasos, reduciendo en gran medida el tiempo y el esfuerzo requerido por parte del investigador durante el proceso. Por lo que permite grandes búsquedas y secuencias repetidas de mayor calidad. Es decir, con la evolución dirigida continua conseguimos que se imiten los ciclos de diversificación y selección del proceso de evolución biológica durante muchas generaciones en un menor tiempo.



**Phage display** (presentación de fagos) Es un método de screening de alto rendimiento, es decir lo podremos englobar dentro de mutagenesis aleatorizada. Lo primero que debemos saber es ¿qué es un fago?: Los bacteriófagos o fagos son virus que infectan bacterias para realizar su ciclo vital. En 1985, George P. Smith fue el primero en describir la tecnología de presentación de fagos o phage display al demostrar que al insertar un fragmento de ADN extraño en el gen de la proteína de la cápside del fago este mostrará la proteína en su superficie<sup>19</sup>. Posteriormente en 1988 Parmley y Smith describieron un proceso de selección y enriquecimiento por afinidad conocido como "panning o biopanning" (figura 6)<sup>20 21</sup>, que implica 4 pasos para seleccionar las proteínas.

- El primer paso es preparar **bibliotecas de phage display**. Esto es necesario para poder insertar el gen mutado para que el fago muestre la proteína deseada en su superficie. Las proteínas, pIII y pVIII, de la cápside del fago M13 (figura 5) son las más utilizadas.

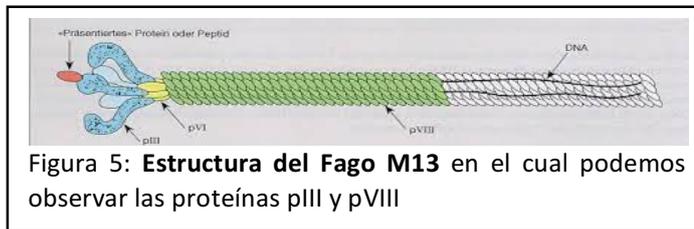


Figura 5: **Estructura del Fago M13** en el cual podemos observar las proteínas pIII y pVIII

- El segundo paso es el de **captura**. Implica modificar la biblioteca de fagos para conseguir el objetivo deseado. Utiliza interacciones específicas para que solo los péptidos deseados que presenta el fago se unan a la superficie sólida (anticuerpo...) y así cribarlos.
- El tercer paso es el de **lavado** en el cual se eliminan los fagos no unidos a la superficie, por lo tanto, solo se mantienen aquellos que estén unidos con una alta afinidad.
- El cuarto paso es el de **elución** donde los fagos unidos se eluyen gracias a cambios en el pH, temperatura u otras condiciones ambientales.

Recordemos que es un proceso que se engloba en la mutagénesis aleatorizada por lo que el ciclo se puede repetir muchas veces para conseguir proteínas con una mayor afinidad.

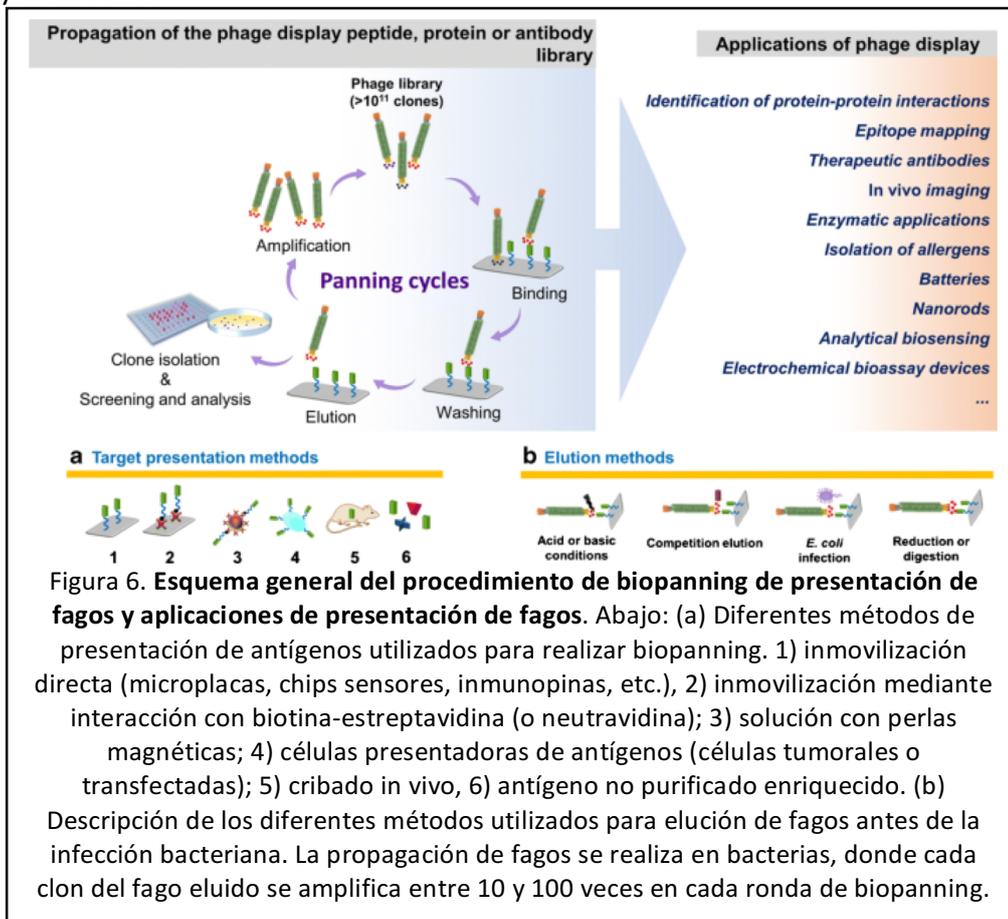


Figura 6. **Esquema general del procedimiento de biopanning de fagos y aplicaciones de presentación de fagos**. Abajo: (a) Diferentes métodos de presentación de antígenos utilizados para realizar biopanning. 1) inmovilización directa (microplacas, chips sensores, inmunopinas, etc.), 2) inmovilización mediante interacción con biotina-estreptavidina (o neutravidina); 3) solución con perlas magnéticas; 4) células presentadoras de antígenos (células tumorales o transfectadas); 5) cribado in vivo, 6) antígeno no purificado enriquecido. (b) Descripción de los diferentes métodos utilizados para elución de fagos antes de la infección bacteriana. La propagación de fagos se realiza en bacterias, donde cada clon del fago eluido se amplifica entre 10 y 100 veces en cada ronda de biopanning.

Más tarde, Winter y McCafferty, en el laboratorio de biología molecular MRC, fueron los primeros en utilizar el phage display en el descubrimiento de anticuerpos mediante la creación de bibliotecas de anticuerpos en fagos los cuales se utilizarían para poder generar anticuerpos monoclonales específicos<sup>22</sup>.

Los métodos de mutagénesis directa y aleatorizada se pueden combinar dando un **diseño semirracional**, el cual combina las ventajas del diseño de proteínas racional (mutagénesis sitio-específico) y la evolución continuada (mutagénesis aleatorizada). Las mutaciones beneficiosas son raras, por lo que se necesita analizar un gran número de mutaciones para encontrar la variante que mejore la función. El enfoque semirracional crea “bibliotecas enfocadas” que se concentran en las regiones que se cree que son más ricas en mutaciones beneficiosas y así realizar sobre ellas un proceso mutagénesis aleatorizada y además estas bibliotecas contienen menos variantes, por lo tanto, no requiere un cribado de alto rendimiento.<sup>18</sup>

Todos los procesos explicados anteriormente son los procesos que utiliza la ingeniería proteica para la creación de las proteínas terapéuticas, por lo que es fundamental conocer los procesos de forma básica para entender cómo se crean los distintos tipos de proteínas terapéuticas.

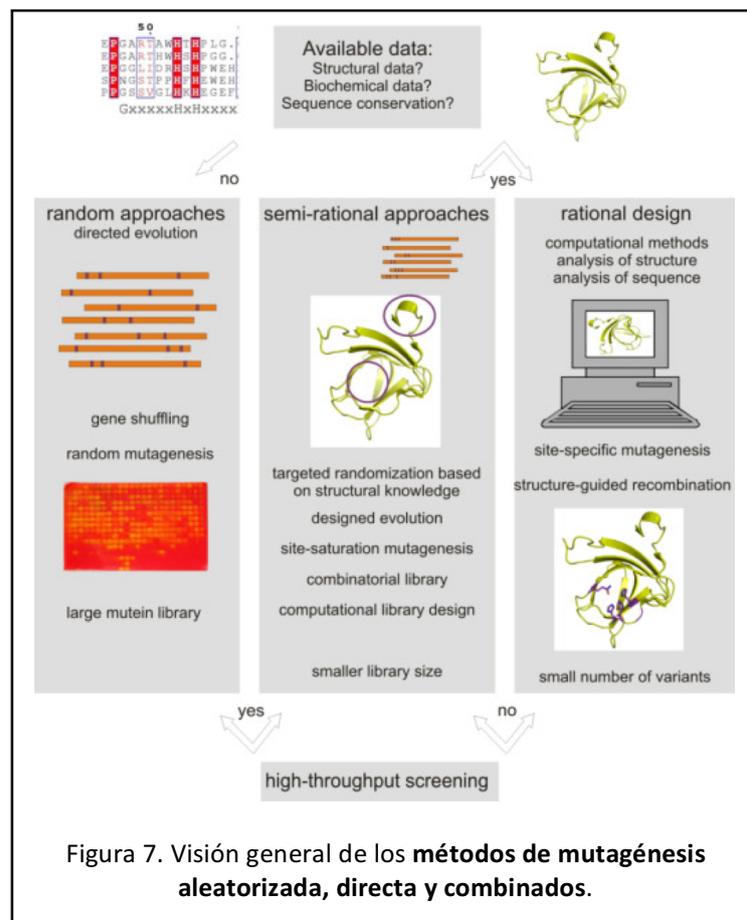


Figura 7. Visión general de los **métodos de mutagénesis aleatorizada, directa y combinados**.

## 3. Proteínas terapéuticas.

### 3.a. Hormonas

- **Insulina:**

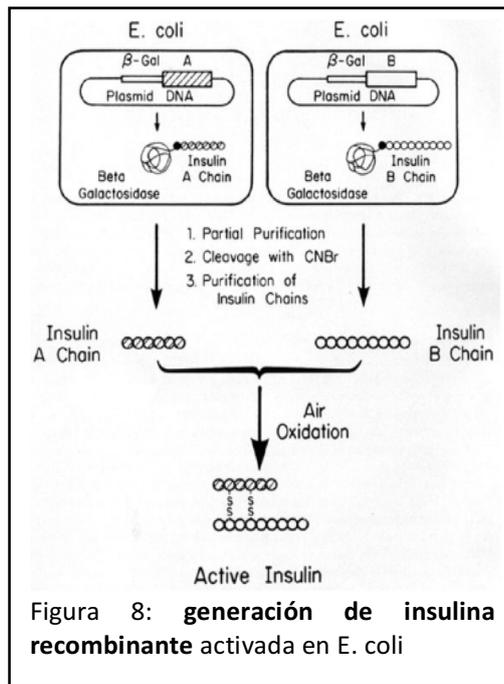
La insulina fue descubierta en febrero de 1922 por Frederick G. Banting, Charles Best, James Collip y J.J.R. Macleod de la Universidad de Toronto, además el Dr. Banting recibió el Premio Nobel de Fisiología o Medicina por este descubrimiento. Aunque años después se supo que el verdadero descubridor fue el fisiólogo Nicolae Paulescu en 1921, aunque su artículo no fue publicado hasta Abril de 1922<sup>23</sup>.

La insulina es una hormona pequeña conformada por 51 aminoácidos en dos cadenas (A y B) que están unidas por puentes disulfuro entre residuos de cisteína, y es una proteína que ha sido altamente conservada en el tiempo. Es secretada por las células  $\beta$  de los islotes de Langerhans del páncreas, su secreción es continua, pero a un ritmo basal bajo que se eleva mucho cuando hay estímulos alimenticios. Estimula la captación, utilización y almacenamiento de glucosa, aminoácidos y proteínas e impide la degradación de glucógeno, grasa y proteína.

La insulina está íntimamente relacionada con la Diabetes Mellitus (DM). La DM tipo 1 es una patología en la cual el cuerpo no produce insulina ya que las células beta del páncreas endocrino son destruidas por un proceso autoinmune que normalmente se inicia antes de los 15 años y necesitarán tratamiento de por vida con distintas pautas insulínicas. En la DM tipo 2, la más común, el cuerpo posee una resistencia o una baja producción de insulina. La insulino terapia es el tratamiento de elección en la DM tipo 1 y en un amplio porcentaje, dependiendo de la gravedad, en la DM tipo 2.

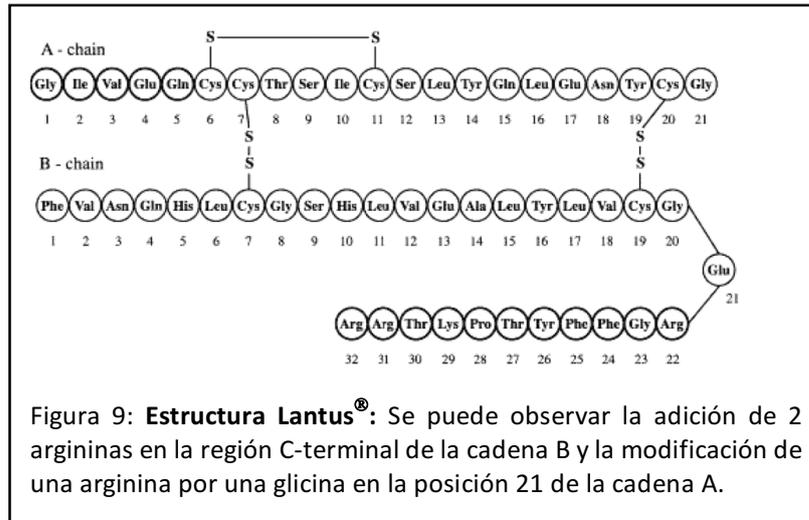
Antes de entrar de lleno en la insulino terapia debemos saber que no se puede administrar por vía oral ya que los jugos gastrointestinales la hidrolizan, también es difícil administrarla correctamente a través de las mucosas por su tamaño molecular (3800Da), por lo que se suele administrar vía subcutánea excepto la de acción rápida que ha de ser por vía intramuscular, intravenosa e intraperitoneal.

La insulino terapia empezó tras el descubrimiento de la misma, que se testó por primera vez en un humano diabético, observándose una mejoría rotunda de su estado, pero se empleó insulina bovina la cual provocaba muchos efectos secundarios por sus impurezas (difiere en 3 aminoácidos de la humana), los experimentos avanzaron y en 1936 hubo un gran avance ya que Hagedorn añade protamina a la insulina soluble y consigue una insulina de acción intermedia y esto ayudo a la formulación de insulinas de acción prolongada. En 1978 Genetech produce insulina humana en *Escherichia coli* mediante ingeniería genética (figura 8); lo que hicieron fue introducir los genes que codifican las cadenas A y B de la insulina en el gen  $\beta$ -galactosidasa de *E. Coli* mediante un vector (pBR322); ya que las bacterias producen  $\beta$ -galactosidasa fusionada a la insulina y así poder ser detectada, , después se llevan a cabo las fases de la mutagenesis explicadas anteriormente y mediante la oxidación de las cisteínas, forman los puentes disulfuro de la proteína activa y consiguieron la insulina humana recombinante (Humilin<sup>®</sup>), más potente, segura y barata de producir y tenía menos efectos secundarios.<sup>24</sup>



Hoy en día existe una amplia variedad de insulinas que se utilizan para el tratamiento de los diabéticos, las dos más importantes son Humalog<sup>®</sup> y Lantus<sup>®</sup>.

- Humalog<sup>®</sup> (Insulina lispro): Es una insulina de acción ultrarrápida, existen otras (aspártica y glulisina) pero la más importante es la lispro. Se utilizan para el tratamiento de adultos y niños con diabetes mellitus tipo 1 o 2 que requieren insulina para el mantenimiento de la homeostasia normal de la glucosa. También está indicado en la estabilización inicial de la diabetes mellitus. Su proceso de síntesis es mediante el sistema de expresión *E. Coli*, al cual se le añade el gen de la insulina lispro, que la diferencia es que la insulina humana tiene los aminoácidos lisina y prolina en las posiciones B28 y B29, mientras que la insulina lispro tiene estos aminoácidos en las posiciones inversas, con prolina en la posición B28 y lisina en la posición B29 lo cual le permite tener una absorción más rápida ya que inhibe la formación de dímeros de insulina.<sup>25</sup>
- Lantus<sup>®</sup> (insulina glargina): Es una insulina de acción prolongada por lo que tan solo hay que administrarla 1 vez al día. Su síntesis es también mediante la introducción del gen en el *E. Coli* gracias a la tecnología de ADN recombinante. La diferencia con la insulina humana es que se obtiene al añadir 2 argininas en la región C-terminal de la cadena B y sustituir la arginina por glicina en la posición 21 de la cadena A (figura 9)<sup>26</sup>. Estas modificaciones provocan la adición de 2 cargas positivas en la molécula, con lo que el punto isoelectrico cambia de pH 5,4 a 6,7. Esto provoca que Lantus<sup>®</sup> sea menos soluble al pH fisiológico del tejido subcutáneo (4,5-5,9) y por lo que se creen microprecipitados de glargina que se van absorbiendo lentamente. Además, añade zinc, haciendo que cristalice en el tejido subcutáneo, lo que retrasa aún más su absorción. Estas propiedades provocan un perfil de concentración plasmática sin picos a lo largo de 20-24 horas. Su acción comienza 1-2h después de administrarse por vía subcutánea.<sup>27</sup>



- **Somatropina o rhGH**: La hormona del crecimiento (GH) es una cadena polipeptídica de 191 aminoácidos que contiene dos enlaces disulfuro y un peso molecular de 22 kDa. La GH humana recombinante (rhGH) se usa actualmente para el tratamiento de insuficiencia renal crónica, talla baja, síndrome de Turner, Prader-Willi y deficiencia del gen SHOX (Short Stature Homeobox).

Lo que a nosotros nos interesa es la sintetizada mediante ADN recombinante. Esta hormona recombinante tiene los mismos efectos que la hormona del crecimiento biológica. Su síntesis se hace insertando el gen GH1, localizado en el brazo largo del cromosoma 17 (17q24.2) en el genoma de *E. Coli* normalmente o de *células de mamífero* a través de mutagenesis sitio-específico. Aunque al no requerir modificaciones postraduccionales, rhGH se suele fabricar en sistemas de expresión de bacterias<sup>28 29</sup>.

La primera rhGH fue aprobada en 1985, tenía una secuencia idéntica a la humana, excepto un residuo de metionina extra en el extremo N-terminal de la cadena (que se pensaba prolongaba su vida media), pero daba efectos secundarios por lo que se interrumpió su venta en los 90s. En 1989 logran eliminar la metionina extra y se obtiene rhGH idéntica a la humana, es decir, 22 kDa y 191 aminoácidos. Los laboratorios Pfizer, Novo Nordisk, Eli Lilly y Genentech la sintetizan mediante el sistema de expresión de *E.coli* y el laboratorio Merck la sintetiza mediante *células de mamífero*<sup>30</sup>.

Por lo que a día de hoy existen un gran número de fármacos de somatropina aprobados por la EMA, Omnitrope®, Genotropin®, Saizen® ...

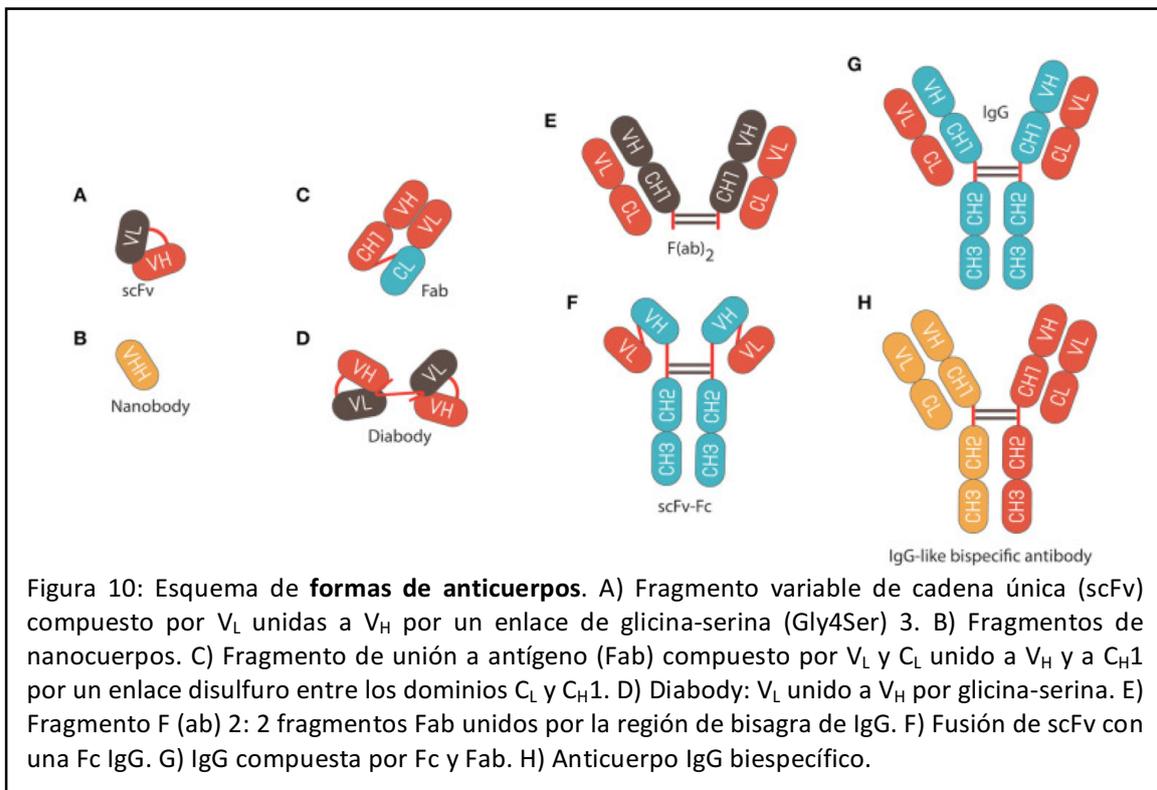
### 3.b. Anticuerpos recombinantes.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son producidos por cada estirpe o clon de linfocitos B y se dirigen específicamente a los antígenos deseados. Antes de detallar la función de los anticuerpos monoclonales vamos a detallar cómo es la estructura de un anticuerpo o inmunoglobulina (Ig).

Los anticuerpos (Figura 10) están compuestos por 2 cadenas, una ligera (L) que está formada por un dominio variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ) y otra pesada (H) que contiene un dominio variable ( $V_H$ ), un dominio constante ( $C_H$ ) y una región bisagra. La  $V_H$  difiere en los anticuerpos producidos en los diferentes linfocitos B, pero es idéntica para todos los anticuerpos producidos por el mismo linfocito B o por su línea clonal.

El *fragmento de unión al antígeno* o región Fab. Está compuesta de un dominio constante y otro variable de cada una de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo. Y contiene el paratopo, lugar de unión del antígeno.

La región Fc está compuesta por dos o tres dominios constantes de ambas cadenas pesadas, dependiendo de la clase del anticuerpo. Mediante la unión a proteínas específicas la región Fc se asegura que cada anticuerpo genera una respuesta inmune apropiada para un antígeno dado.<sup>31 32</sup>



Los mAbs se pueden generar mediante 4 técnicas explicadas brevemente en la figura 12, aunque más adelante entraremos en detalle.

Actualmente hay 102 anticuerpos monoclonales aprobados por la FDA y 18 que están en revisión. Detallaremos 2 de ellos, adalimumab y el bevacizumab, creados mediante 2 técnicas distintas: Phage Display, explicado en el apartado 2.C. e hibridoma.

- El **hibridoma**

A los animales de laboratorio, mamíferos y normalmente ratones, se les expone a un antígeno para el cual se generará un anticuerpo. Esto se consigue mediante la inyección durante varias semanas del antígeno deseado en el ratón. El anticuerpo así formado será un anticuerpo policlonal porque diferentes moléculas de anticuerpo reconocen epítopos diferentes del mismo antígeno. Después se aíslan los esplenocitos del bazo del

ratón que contiene las células B que se fusionan con células inmortalizadas de mieloma, las cuales se seleccionan de antemano para asegurarse de que no secretan anticuerpos por sí mismas y que carecen del gen de hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT), lo que las hace sensibles al medio HAT.

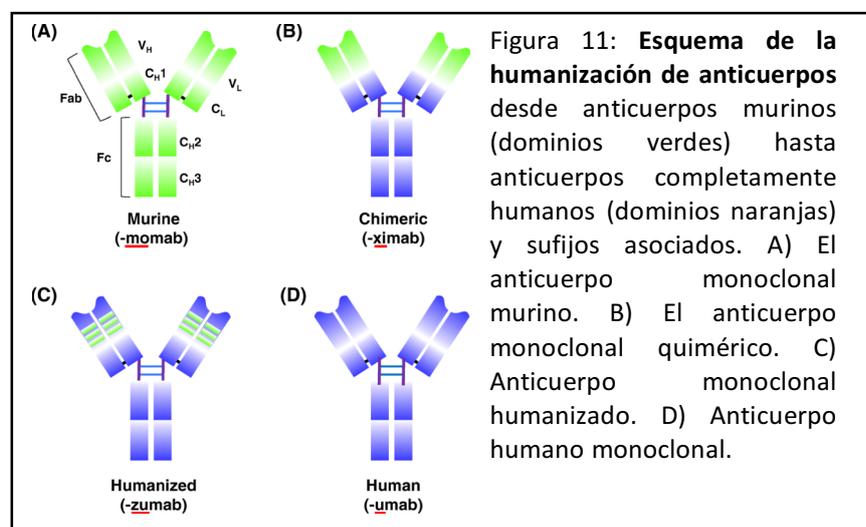
Se fusionan mediante electrofusión, la cual hace que las células B y las del mieloma se fusionen mediante un campo eléctrico, o mediante procesos químicos utilizando polietilenglicol. La fusión de ambas células produce un tipo de célula inmortal con capacidad virtualmente ilimitada de producción de anticuerpos monoclonales, llamada **hibridoma**, que se cultiva en el medio HAT (medio hipoxantina-aminopterin-timidina) durante aproximadamente 10 a 14 días. La aminopterin bloquea la vía que permite la síntesis de nucleótidos. Por lo tanto, las células de mieloma no fusionadas mueren, ya que no pueden producir nucleótidos por las vías de novo o de rescate al carecer de HGPRT. Las células B no fusionadas mueren porque tienen una vida corta. De esta forma, solo sobreviven los híbridos de células B-mieloma, ya que el gen HGPRT procedente de las células B es funcional.

A continuación, el medio se diluye en placas de pocillos múltiples hasta que cada pocillo contenga sólo una célula. Dado que los anticuerpos de un pocillo son producidos por la misma célula B, se dirigirán hacia el mismo epítipo y, por lo tanto, son anticuerpos monoclonales.

El siguiente paso es un proceso de cribado primario rápido, que identifica y selecciona solo aquellos hibridomas que producen anticuerpos de la especificidad adecuada.

La célula B que produce los anticuerpos deseados se puede clonar para producir muchos clones, hijos idénticos. Una vez que se establece una colonia de hibridomas, crecerá continuamente en un medio de cultivo específico y producirá anticuerpos. Una vez seleccionados se cambian los pocillos por matraces de cultivo de tejidos más grandes. Lo que hace que los hibridomas se conserve adecuadamente.<sup>8 33</sup>

Así obtenemos mAbs de ratón, los cuales tienen una eficacia terapéutica disminuida (el sistema inmunológico los identifica como extraños y reacciona para destruirlos). Además, hay una mayor presencia de efectos secundarios, como nefrotoxicidad y reacciones alérgicas. Por lo que debemos humanizar el anticuerpo para mantener la especificidad de unión y así su eficacia, pero reduciendo su inmunogenicidad. Este proceso de humanización consta de (figura 11):



- Anticuerpos Quiméricos: Se obtienen mediante técnicas de ADN Recombinante, que se centran en combinar genes que codifican la región constante de Igs humanos mediante vectores con genes que codifican para la región variable de los ratones. Por lo que se conserva  $V_H$  y  $V_L$  del ratón y se une con una región constante de las cadenas humanas ligeras y pesadas (33% animal).
- Anticuerpos Humanizados: La técnica se basa en transferir las CDR (región determinante de la complementariedad) de las inmunoglobulinas del ratón a las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera de las Igs humanas. Por lo que tan solo se conservan las regiones hipervariables o CDR de ratón, unidas a una estructura humana (90% humano y 10% de animal).<sup>34</sup>

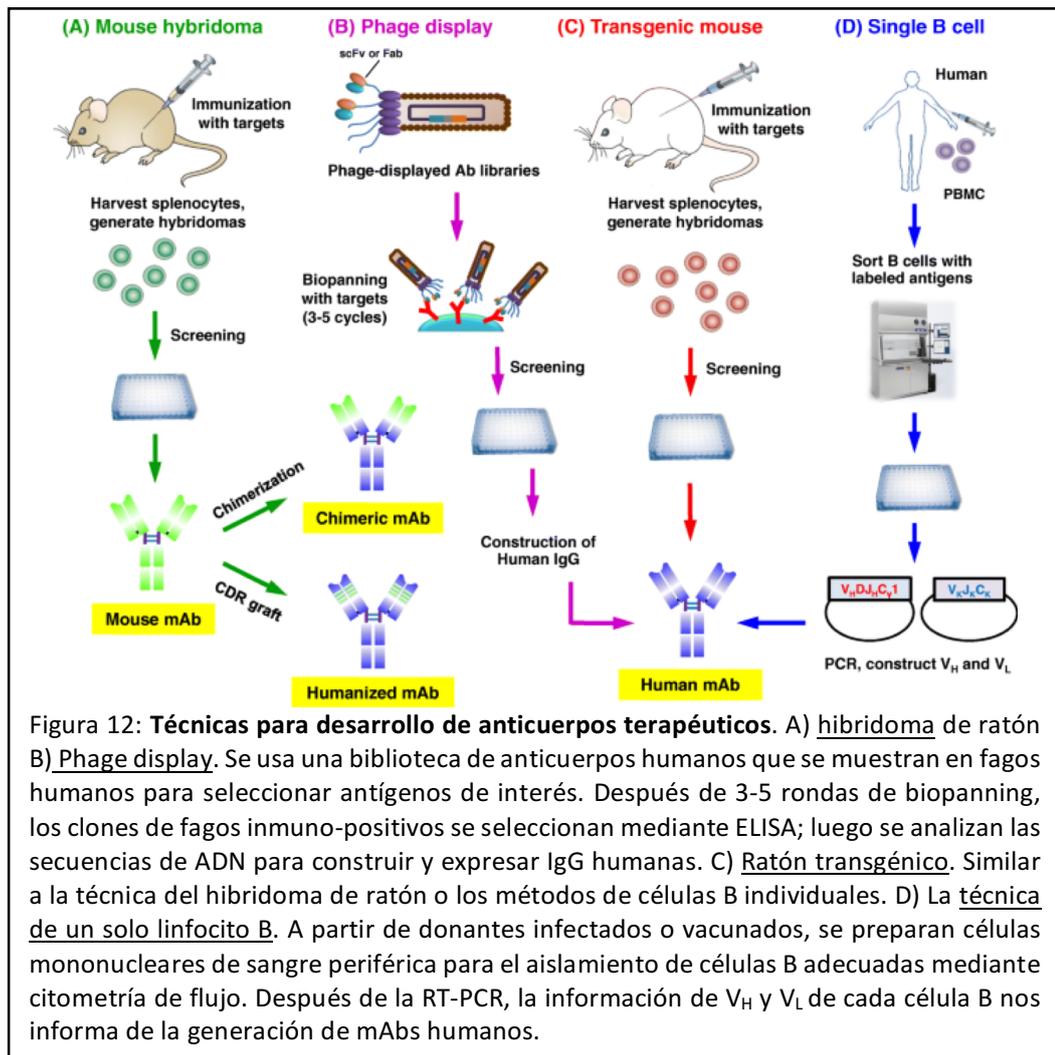


Figura 12: Técnicas para desarrollo de anticuerpos terapéuticos. A) hibridoma de ratón B) Phage display. Se usa una biblioteca de anticuerpos humanos que se muestran en fagos humanos para seleccionar antígenos de interés. Después de 3-5 rondas de biopanning, los clones de fagos inmuno-positivos se seleccionan mediante ELISA; luego se analizan las secuencias de ADN para construir y expresar IgG humanas. C) Ratón transgénico. Similar a la técnica del hibridoma de ratón o los métodos de células B individuales. D) La técnica de un solo linfocito B. A partir de donantes infectados o vacunados, se preparan células mononucleares de sangre periférica para el aislamiento de células B adecuadas mediante citometría de flujo. Después de la RT-PCR, la información de  $V_H$  y  $V_L$  de cada célula B nos informa de la generación de mAbs humanos.

**Bevacizumab** (Avastin<sup>®</sup>) es un anticuerpo monoclonal (IgG) humanizado, se produce por tecnología ADN recombinante a partir de un sistema de expresión *células de ovario de hámster chino* y se administra como una infusión vía intravenosa. Este mAb se une de forma selectiva al *factor de crecimiento endotelial vascular* (VEGF) que se

localiza en las paredes de los vasos sanguíneos y linfáticos del organismo y es necesario para la angiogénesis dentro del tumor. Por lo que inhibe la angiogénesis neutralizando todas las isoformas del VEGF y bloqueando su unión a los *receptores-VEGF* (VEGFR), principalmente VEGFR-1 y VEGFR-2.

VEGFR-1 contribuye a la proliferación celular, supervivencia y permeabilidad, y la activación de VEGFR-2 induce la migración celular y la producción de factor tisular.

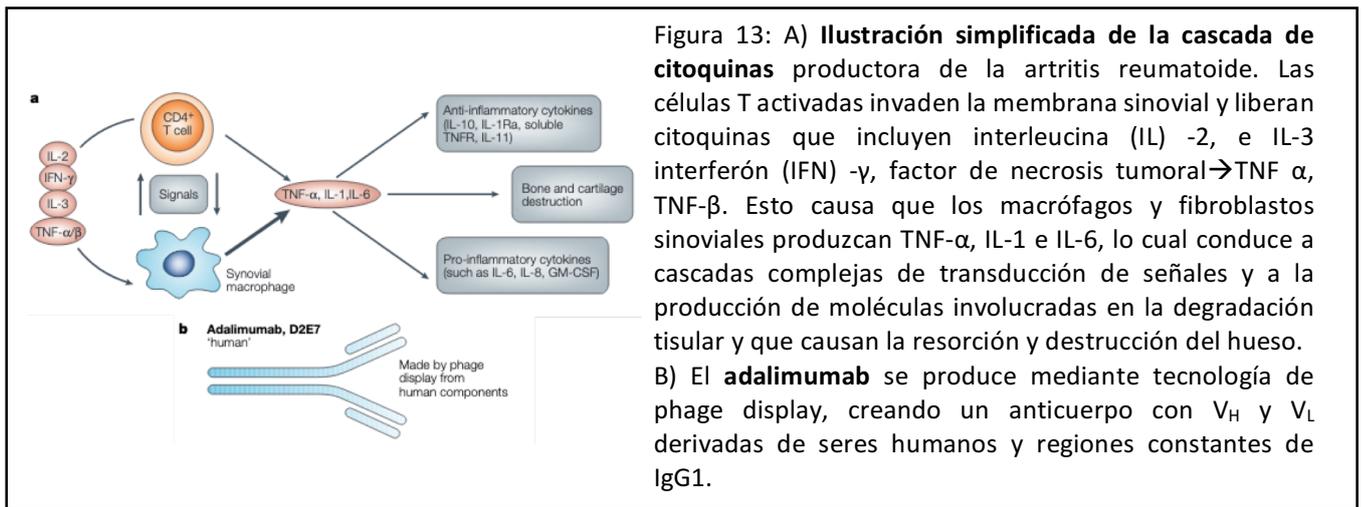
Por lo tanto bevacizumab neutraliza VEGFR, con lo que bloquea el desarrollo del suministro de sangre de las células cancerosas, lo que ayuda a ralentizar el crecimiento tumoral<sup>35</sup>.

Sus indicaciones son <sup>36</sup>:

- Cáncer de colon o recto metastásico: En combinación con quimioterapia.
- Degeneración macular asociada a la edad exudativa: No es una indicación de la ficha técnica, pero sí que es una de sus aplicaciones más conocidas.<sup>37</sup>
- Cáncer de mama metastásico: en combinación con quimioterapia.
- Cáncer de pulmón no microcítico avanzado: se administra junto con un régimen de quimioterapia.
- Cáncer avanzado no microcítico con mutaciones activadoras en el gen que codifica EGFR: en combinación con erlotinib.
- Cáncer de riñón avanzado o metastásico: en combinación con interferón- $\alpha$ 2.
- Cáncer epitelial de ovarios, trompas de Falopio o peritoneo: en combinación con quimioterapia en pacientes con un diagnóstico reciente, pero el cáncer está avanzado o es recidivante.
- Carcinoma cervical persistente, recurrente o metastásico: en combinación con quimioterapia.

**Adalimumab** (Humira<sup>®</sup>) es un anticuerpo monoclonal humano recombinante, aprobado por la FDA en 2002, fue el primer mAb completamente humano comercializado, creado mediante un proceso de phage display mediante la biblioteca scFv-phage de CAT (Cambridge Antibody Technology) y es clonado en *células de Ovario de Hámster Chino*. Se administra mediante inyección subcutánea y la dosis depende de la patología a tratar.<sup>32</sup>

Actúa específicamente frente al *factor de necrosis tumoral* (TNF- $\alpha$ ), que es una citoquina que es producida por diversas células de nuestro cuerpo y provoca un aumento de los síntomas inflamatorios, también induce la apoptosis de los linfocitos que se encuentran anormalmente activados (figura 13). Por lo tanto, el adalimumab actúa uniéndose con gran especificidad y afinidad al TNF- $\alpha$  y bloqueando su unión al *TNF-receptor*, por lo que bloquea la cascada de citoquinas. Los efectos del tratamiento incluyen la disminución de la expresión de otras citoquinas proinflamatorias, como IL-6, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) e IL-8, la detención del daño cartilaginoso y óseo, e incluso hay evidencias de reparación.<sup>38 39</sup>



Esta vía de inhibición conduce a una amplia gama de respuestas antiinflamatorias, gracias a este efecto puede ser utilizado como tratamiento en diferentes patologías como:<sup>40</sup>

- Artritis reumatoide (AR): Adalimumab + metotrexato, está indicado para:
  - AR activa moderada-grave en adultos, si la respuesta a fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARMEs) incluyendo metotrexato haya sido insuficiente.
  - AR activa, grave y progresiva en adultos no tratados previamente con metotrexato.

Adalimumab ha demostrado una reducción en la progresión del daño de las articulaciones cuando se administra en combinación con metotrexato.

- Psoriasis
  - Psoriasis en placas crónica, de moderada - grave en adultos.
- Hidradenitis supurativa
  - hidradenitis supurativa activa (acné inverso) de moderada-grave en adultos y adolescentes mayores de 12 años de edad con una baja respuesta al tratamiento sistémico convencional de hidradenitis supurativa.
- Enfermedad de Crohn
  - Enfermedad de Crohn activa moderada-grave, en adultos sin respuesta a un tratamiento, completo y adecuado con corticosteroides y/o inmunosupresores, o que son intolerantes o con contraindicaciones médicas para dichos tratamientos.
- Enfermedad de Crohn pediátrica
  - EC activa moderada-grave, en pacientes pediátricos mayores de 6 años, con respuesta insuficiente al tratamiento convencional incluyendo tratamiento nutricional primario y un corticosteroide y/o un inmunomodulador, o que son intolerantes o tienen contraindicados dichos tratamientos.
- Colitis ulcerosa
  - Colitis ulcerosa activa moderada-grave, en adultos con una respuesta inadecuada al tratamiento convencional [corticosteroides y 6-

mercaptopurina o azatioprina] o que presentan intolerancia o contraindicaciones médicas a dichos tratamientos.

- Uveítis
  - Uveítis no infecciosa intermedia y posterior y panuveítis en adultos con una mala respuesta a corticoesteroides, que necesiten disminuir el tratamiento con corticoesteroides.
- Uveítis pediátrica
  - Uveítis pediátrica anterior crónica no infecciosa en pacientes mayores de 2 años de edad que han tenido una respuesta inadecuada o en los que la terapia convencional no es adecuada.

### 3.c. Enzimas

Dornasa alfa Pulmozyme® (ADNasa I)

La fibrosis quística es una enfermedad hereditaria, autosómica recesiva que provoca mutaciones localizadas en el brazo largo del cromosoma 7, exactamente en el gen regulador de la conductibilidad transmembrana (CFTR).

Sin suficientes copias funcionales de la proteína CFTR en sus membranas, las células epiteliales no pueden bombear suficiente agua en las secreciones, lo cual provoca secreciones demasiado espesas, viscosas y que tienden a obstruir los conductos de diversos órganos, especialmente las vías pulmonares de pequeño calibre.<sup>41</sup>

Las personas con fibrosis quística son muy susceptibles a las infecciones pulmonares bacterianas y la presencia de bacterias contribuye a la acumulación de mucosidad espesa en los pulmones y esto dificulta mucho la respiración y actúa como fuente de nuevas infecciones.

El moco espeso que se genera está compuesto por el alginato que es secretado por las bacterias vivas, el ADN liberado cuando las bacterias son lisadas, la degradación de los leucocitos acumulados en respuesta a la infección y la actina filamentosa derivada de las células epiteliales dañadas.

Para abordar este problema, se aisló el gen de la enzima humana desoxirribonucleasa I (ADNasa I), cuya función es hidrolizar cadenas largas de ADN en secuencias mucho más cortas.

La enzima es producida mediante mutagenesis sitio-específica utilizando como sistema de expresión un cultivo de *células de ovario de hámster chino*. La enzima purificada se administra en forma de aerosol 1 vez al día.

La ADNasa1 se une de forma muy estrecha a la actina monomérica lo cual inhibe su capacidad para escindir el ADN, se ha estudiado que aminoácidos interactúan con la actina y así descubrir dianas donde variar el aminoácido mediante mutagénesis sitio-específica. Por ejemplo, el cambio del aminoácido 144 de alanina a arginina o el aminoácido 65 de tirosina a arginina redujo la interacción entre ADNasa I y actina hasta 10.000 veces. Aunque Pulmozyme® no tiene esos cambios y65r.<sup>42</sup>

Indicaciones:

- Fibrosis quística
  - Mayores de 5 años de edad con fibrosis quística y una capacidad vital forzada mayor del 40%.<sup>43</sup>

Se utiliza como mucolítico en otras patologías como el síndrome respiratorio agudo, pero su indicación esta fuera de ficha técnica<sup>44</sup>.

### 3.d. Interferón y otros inmunomoduladores

Los interferones (IFNs) son unas proteínas plasmáticas señalizadoras, que pertenecen a las citoquinas al igual que el TNF, secretadas sobre todo por los linfocitos T, y las natural killers ante la presencia de patógenos como virus, bacterias, parásitos y células tumorales que cumple 2 funciones: Inhiben la replicación del patógeno en el interior de las células y ayudan a la destrucción de células infectadas o células tumorales.

En el humano hay 3 tipos:

- Interferón  $\alpha$  e interferón  $\beta$  son secretados ambos por fibroblastos y monocitos infectados y así señala el problema a las células vecinas no patológicos y así estas pueden sintetizar proteínas antivirales.
- Interferón  $\gamma$  es secretado por linfocitos T y natural killers al contactar con células infectadas o células tumorales.<sup>45</sup>

Los interferones recombinantes son creados mediante ADN recombinante en distintos sistemas de expresión: IFN- $\beta$ 1a  $\rightarrow$  células de ovario de hámster chino. IFN- $\beta$ 1b, IFN- $\alpha$ 2a/2b, IFN- $\gamma$  1b  $\rightarrow$  *E.coli*.

Sus aplicaciones son:

- IFN- $\beta$ 1a/1b humano recombinante: Esclerosis múltiple.
- IFN- $\alpha$ 2a/2b humano recombinante: hepatitis B y C crónicas, tricoleucemia, sarcoma de Kaposi, leucemia mieloide crónica, melanoma maligno, tumores renales.
- IFN- $\gamma$  1b humano recombinante: Enfermedad granulomatosa crónica.<sup>44</sup>

Dentro de este apartado se incluyen varios anticuerpos monoclonales ya que tienen acción inmunomoduladora: Muromonab, Daclizumab, Rituximab, Adalimumab....

### 3.e. Factores de coagulación

Cuando se produce una hemorragia en el organismo, un factor esencial es la cascada de la coagulación sanguínea. De esta cascada forman parte los factores de coagulación, que son proteínas que ayudan a formar el coagulo de fibrina. Son trece los factores de coagulación conocidos hasta el momento y todos ellos necesitan de cofactores que los activen como el calcio o los fosfolípidos. Cuando hay una deficiencia o un mal funcionamiento de un factor de coagulación, el proceso de hemostasia secundaria se alterará y se impedirá la formación del coágulo.<sup>47</sup>

Existen numerosos trastornos hemorrágicos inusuales, pero la enfermedad más conocida es la **hemofilia**, que es una enfermedad hereditaria ligada al sexo caracterizada por una deficiencia de factores de la coagulación. Existen varios tipos de hemofilia, pero los más comunes son la A y la B. En la Hemofilia A o clásica hay un déficit del factor VIII, representando entorno al 80% de los casos de hemofilia en el mundo. En la hemofilia B o enfermedad de Christmas hay un déficit del factor IX.<sup>48</sup>

En 1984 creó el factor VIII recombinante. Los ensayos clínicos en humanos comenzaron 3 años más tarde y en 1992, se autorizó el primer factor VIII recombinante, Recombinate®, que fue sintetizado en *CHO*, siendo un tratamiento revolucionado al brindar más seguridad y eficacia. Actualmente, existen más de 12 productos recombinantes del factor VIII en el mercado y 5 del factor IX, mientras se sigue investigando e intentando desarrollar factores de coagulación recombinantes que nos aporten un tratamiento optimizado y con un menor número de efectos secundarios. Los últimos factores VIII de la coagulación recombinantes (Nuwiq®, Eloctate®) que se han desarrollado han sido en el sistema de expresión *HEK293* (células de riñón de embrión humano), ya que producen una glicosilación similar al humano y así se mejora la función y se reduce la inmunogenicidad.<sup>49</sup>

## 4. Perspectivas de futuro

El desarrollo de la biotecnología y los progresos médicos y científicos de los últimos 50 años, nos llevan a un escenario nuevo en el cual se van a desarrollar cientos de nuevos fármacos, que actúen sobre dianas terapéuticas específicas. Las últimas estimaciones calculan que existen entre 20.000 y 25.000 genes en el genoma humano, de los que sobre 5.000 podrían estar implicados en procesos patológicos, aunque se estima que entorno a 600 y 1.500 son las potenciales de dianas terapéuticas <sup>50</sup>.

Si a esto le sumamos el desarrollo exponencial de las tecnologías genómicas y proteómicas las cuales nos ayudaran a detectar los genes y proteínas causantes de distintas patologías, esto nos proporcionará una base para su tratamiento. Por lo que en un futuro cercano lo que se impondrá será tratar a la persona y no la enfermedad, es decir terapia personalizada. Porque, aunque los seres humanos se asemejen genéticamente en un 99%, cada individuo enferma y responde al tratamiento de forma distinta.

Esto tiene tanta relevancia que se ha desarrollado lo que se conoce con **farmacogenética**, que estudia la relación de los factores genéticos que influyen en la respuesta variable de los individuos a cierto medicamento, por lo que los genes responsables del metabolismo de los medicamentos, sobretodo en el hígado poseen una gran relevancia, entre ellos los genes citocromo P450. De modo que es un completo error tratar por igual a todos los pacientes, ya que cada uno puede responder de distinta manera; por ejemplo, en el Asma el 40%-75% de los pacientes no responden a los beta 2 agonistas. <sup>51</sup>

Debido a la variabilidad interindividual en el comportamiento de los medicamentos, el futuro de los tratamientos serán las **terapias personalizadas**, en las cuales el perfil fenotípico y genotípico de cada paciente será la clave del tratamiento. El campo donde la terapia personalizada más ha avanzado es la oncología. Existen varios ejemplos, como puede ser el carcinoma ductal de mama, en el cual el tratamiento depende del subtipo de tumor, si posee receptores hormonales, si son cánceres tipo HER2 positivo o si son triple negativo. <sup>52</sup>

- Receptores hormonales positivos: hormonoterapia con tamoxifeno (pre y postmenopausicas) o letrozol (solo administrar en postmenopausicas) + quimioterapia.
- HER2+: Se añade al tratamiento quimioterapico el trastuzumab y si el cáncer ha metastatizado o en estadio IV se le añadirá trastuzumab + pertuzumab.
- Triple basal: Solo quimioterapia.

Otro ejemplo es el carcinoma no microcitico de pulmón, a los pacientes portadores de una mutación en EGFR se les podrá administrar erlotinib o gefitinib, los cuales no poseen efecto entre los no portadores de la mutación. Y la gran mayoría de nuevos fármacos, tanto para el tratamiento oncológico como el de otras patologías se desarrollan mediante técnicas de ingeniería genética y ADN recombinante. <sup>53</sup>

A pesar de la crisis mundial en la que estamos sumidos a causa de la pandemia por el SARS-CoV-2, están en investigación multitud de nuevos fármacos, muchos de ellos anticuerpos monoclonales. Desde el 1 de enero al 23 de abril de 2021, La FDA ha aprobado 3 anticuerpos monoclonales (Loncastuximab tesirine, Evinacumab y

Dostarlimab) y la EMA 2 (fam-trastuzumab deruxtecan y Moxetumomab pasudotox) aunque estos fármacos ya estaban aprobados por la FDA.

Y por último la otra gran vía en desarrollo es la **nanomedicina**, incluida dentro de la nanociencia, que es un área emergente que se ocupa del estudio de los materiales a escala nanométrica, es decir, una milmillonésima parte de un metro.

Las principales áreas de aplicación de la nanomedicina son: técnicas analíticas y medios diagnósticos, cirugía y liberación de fármacos por medio de nanosistemas.

El objetivo de los Nanosistemas de Liberación de Fármacos es transportar fármacos específicamente a los tejidos diana, mejorar su solubilidad, tener baja toxicidad y proporcionar vías alternativas de administración de fármacos.<sup>54 55</sup>

La nanomedicina es la puerta de entrada para estrategias de diagnóstico y tratamiento que mejores y superen los obstáculos de las terapias convencionales. Se considera que revolucionara el diagnóstico y el tratamiento de los cánceres, ya que su tamaño permite una menor dosis de tratamiento y más específico que el de las terapias convencionales<sup>56</sup>.

Actualmente existen 4 fármacos aprobados por la CIMA: Abraxane<sup>®</sup> y Caelyx<sup>®</sup> que se utilizan en el tratamiento oncológico, CosmoFer<sup>®</sup> su indicación es en adultos con déficit de hierro y Rapamune<sup>®</sup> su indicación es la profilaxis del rechazo de órganos en pacientes trasplantados renales.

Todo esto nos recalca que la biotecnología tiene y tendrá un papel fundamental en la búsqueda de soluciones de los problemas que afectarán a la sociedad para los muchos problemas tanto médicos, alimentarios o medioambientales. Por lo que es una evidencia que la investigación científica es la clave de nuestro futuro.

## REFERENCIAS

1. Barcelos, M. C. S., Lupki, F. B., Campolina, G. A., Nelson, D. L. & Molina, G. The colors of biotechnology: general overview and developments of white, green and blue areas. *FEMS Microbiol. Lett.* **365**, (2018).
2. García, J. L. Ingeniería genética y biotecnología. 38.
3. Bernard R. Glick & Cheryl L. Patten. *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA*. (ASM Press, 2017).
4. Admin. The History of DNA Timeline. *DNA Worldwide* <https://www.dna-worldwide.com/resource/160/history-dna-timeline> (2014).
5. ADN recombinante (rADN) | NHGRI. *Genome.gov* <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/ADN-recombinante>.
6. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W. & Helling, R. B. Construction of Biologically Functional Bacterial Plasmids In Vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 3240–3244 (1973).
7. Garrido, A., Villaverde, C., Blanco, M., Teijón, J., Mendoza, C., Ramírez, J. Tecnología de ADN recombinante. in *Fundamentos de bioquímica metabólica* 337–352 (Tébar, 2006).
8. Lu, R.-M. *et al.* Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J. Biomed. Sci.* **27**, 1 (2020).
9. Valdez-Cruz, D. N. A. Proteínas recombinantes terapéuticas. *hypatia* **32**, 4.
10. Consultora Hygeia. Análisis de impacto presupuestario de los medicamentos biosimilares en el Sistema Nacional de Salud de España (2009 - 2022). (2020).
11. Román Roldán, R. Desarrollo de procesos de producción de proteínas bioterapéuticas: Aumento de la productividad específica en células HEK293. (Universitat Autònoma de Barcelona).
12. Fischer, S., Handrick, R. & Otte, K. The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnol. Adv.* **33**, 1878–1896 (2015).
13. Baeshen, M. N. *et al.* Production of Biopharmaceuticals in E. coli: Current Scenario and Future Perspectives. *J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 953–962 (2015).
14. Nielsen, J. Production of biopharmaceutical proteins by yeast: advances through metabolic engineering. *Bioengineered* **4**, 207–211 (2013).
15. Vassylyeva, M. N. *et al.* Efficient, ultra-high-affinity chromatography in a one-step purification of complex proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, E5138–E5147 (2017).
16. Seyedinkhorasani, M. *et al.* Affinity Based Nano-Magnetic Particles for Purification of Recombinant Proteins in Form of Inclusion Body. *Iran. Biomed. J.* **24**, 192–200 (2020).
17. Morrison, M. S., Podracky, C. J. & Liu, D. R. The developing toolkit of continuous directed evolution. *Nat. Chem. Biol.* **16**, 610–619 (2020).
18. Kumar, A. & Singh, S. Directed evolution: tailoring biocatalysts for industrial applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **33**, 365–378 (2013).
19. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315–1317 (1985).
20. Barderas, R. & Benito-Peña, E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Anal. Bioanal. Chem.* **411**, 2475–2479 (2019).
21. Smith, G. P. & Petrenko, V. A. Phage Display. *Chem. Rev.* **97**, 391–410 (1997).
22. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552–554 (1990).
23. de Leiva, A., Brugués, E. & de Leiva-Pérez, A. El descubrimiento de la insulina:

- continúan las controversias después de noventa años. *Endocrinol. Nutr.* **58**, 449–456 (2011).
24. Riggs, A. D. Making, Cloning, and the Expression of Human Insulin Genes in Bacteria: The Path to Humulin. *Endocr. Rev.* (2020) doi:10.1210/endrev/bnaa029.
  25. Dhayalan, B. *et al.* Scope and Limitations of Fmoc Chemistry SPPS-Based Approaches to the Total Synthesis of Insulin Lispro via Ester Insulin. *Chem. – Eur. J.* **23**, 1709–1716 (2017).
  26. ter Braak, E. W. *et al.* Injection site effects on the pharmacokinetics and glucodynamics of insulin lispro and regular insulin. *Diabetes Care* **19**, 1437–1440 (1996).
  27. de Luis, D. A. & Romero, E. Análogos de insulina: modificaciones en la estructura, consecuencias moleculares y metabólicas. *Med. Fam. SEMERGEN* **39**, 34–40 (2013).
  28. Rezaei, M. & Zarkesh-Esfahani, S. H. Optimization of production of recombinant human growth hormone in *Escherichia coli*. *J. Res. Med. Sci. Off. J. Isfahan Univ. Med. Sci.* **17**, 681–685 (2012).
  29. Keshavarz, R., Babaeipour, V., Mohammadpour-Aghdam, M. & Deldar, A. A. Overexpression, overproduction, purification, and characterization of rhGH in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2020) doi:10.1002/bab.1902.
  30. Blizzard, R. M. History of Growth Hormone Therapy. *Indian J. Pediatr.* **79**, 87–91 (2012).
  31. Antibodies | Free Full-Text | Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics | HTML. <https://www.mdpi.com/2073-4468/8/4/55/htm>.
  32. Alfaleh, M. A. *et al.* Phage Display Derived Monoclonal Antibodies: From Bench to Bedside. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
  33. Parray, H. A. *et al.* Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int. Immunopharmacol.* **85**, 106639 (2020).
  34. Waldmann, H. Human Monoclonal Antibodies: The Benefits of Humanization. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1904**, 1–10 (2019).
  35. Braghiroli, M. I., Sabbaga, J. & Hoff, P. M. Bevacizumab: overview of the literature. *Expert Rev. Anticancer Ther.* **12**, 567–580 (2012).
  36. European Medicines Agency. Informe Público Europeo de Evaluación (EPAR) para Avastin. (2017).
  37. Sociedad Española de Retina y Vítreo. Tratamiento de la Degeneración macular asociada a la edad (DMAE) exudativa y atrófica. (2014).
  38. Carretero Colomer, M. Adalimumab. *Offarm* **24**, 136–138 (2005).
  39. Bain, B. & Brazil, M. Adalimumab. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2**, 693–694 (2003).
  40. CIMA (agencia española del medicamento y productos sanitarios). FICHA TÉCNICA HUMIRA 80 MG SOLUCION INYECTABLE EN PLUMA PRECARGADA. (2008).
  41. T., J. M. & V., P. F. FIBROSIS QUÍSTICA EN EL ADULTO. *Rev. Médica Clínica Las Condes* **26**, 276–284 (2015).
  42. Bernard R. Glick Cheryl L. Patten. Protein therapeutics. in *Molecular biotechnology: principles and applications of recombinant DNA* 379–426 (ASM Press).
  43. CIMA (agencia española del medicamento y productos sanitarios). FICHA TÉCNICA PULMOZYME 2.500 U/2,5 ml SOLUCIÓN PARA INHALACIÓN POR NEBULIZADOR. (2015).
  44. Morris, C. & Mullan, B. Use of dornase alfa in the management of ARDS. *Anaesthesia* **59**, 1249–1249 (2004).

45. Negishi, H., Taniguchi, T. & Yanai, H. The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
46. Momblona, S. & M, J. Cuarenta años de interferones. *Farm. Hosp.* **23**, 205–213 (1999).
47. M<sup>a</sup> Luz Juan Marco, F. Javier Rafecas Renau., & Ana I. Rosell Mas. Hemostasia y trastornos hemorrágicos.
48. Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* **58**, 515–523 (2014).
49. Swiech, K., Picanço-Castro, V. & Covas, D. T. Production of recombinant coagulation factors: Are humans the best host cells? *Bioengineered* **8**, 462–470 (2017).
50. Hopkins, A. L. & Groom, C. R. The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 727–730 (2002).
51. Arturo Prior-González, O. *et al.* Farmacogenética y su importancia clínica: hacia una terapia personalizada segura y eficiente. *Med. Univ.* **13**, 41–49 (2011).
52. Radecka, B. & Litwiniuk, M. Breast cancer in young women. *Ginekol. Pol.* **87**, 659–663 (2016).
53. Planchard, D. *et al.* Metastatic non-small cell lung cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **29**, iv192–iv237 (2018).
54. D. Pedro Lorenzo Fernández. *Nanotecnología, Nanomedicina y Nanofarmacología.* (2007).
55. Rojas-Aguirre, Y., Aguado-Castrejón, K. & González-Méndez, I. La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer? *Educ. Quím.* **27**, 286–291 (2018).
56. Misra, R., Acharya, S. & Sahoo, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy. *Drug Discov. Today* **15**, 842–850 (2010).

## Agradecimientos:

El presente trabajo de fin de grado ha sido realizado bajo la supervisión del Doctor Gabriel Moncalián Montes, director del mismo, a quien me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento por su tiempo, dedicación y apoyo durante toda la elaboración.

Me gustaría agradecer el apoyo, la motivación y la ayuda que me ha brindado mi gente: familia, amigos, pareja, para seguir hacia delante y poder cumplir así, mi vocación de ser médico. Porque todo es muy difícil antes de ser fácil.