

**El Residente**

## ARTÍCULO DE REVISIÓN-ENSAYO

# Un acercamiento a la producción de proteínas recombinantes terapéuticas de uso humano

Ramsés A Gamboa,\* Mauricio A Trujillo-Roldán\*

**RESUMEN.** El uso de proteínas terapéuticas o biofármacos en el tratamiento de diversas enfermedades crónicas o deficiencias hereditarias, se ha venido implementando cada vez más en los últimos 30 años. Las proteínas terapéuticas son producidas en sistemas heterólogos *in vitro* mediante tecnología de ADN recombinante. Actualmente, se desarrollan nuevos y mejores sistemas de expresión, implementando nuevos plásmidos, adición de elementos genéticos del gen adicional y optimización de codones. También se desarrollan cepas mutantes que asimilan nutrientes de forma eficiente, aumentando la producción de proteínas recombinantes terapéuticas y/o reducen la producción de compuestos tóxicos que afectan su producción, como también se desarrollan procesos de cultivo cada vez más eficiente para producir las proteínas terapéuticas. Los modelos usados en la industria son bacterias, levaduras, células de insecto y células de mamífero.

**Palabras clave:** Proteínas recombinantes, biofármacos.

**ABSTRACT.** The use of therapeutic proteins or biopharmaceuticals for the treatment of various chronic diseases or hereditary defects, has been increasingly implemented over the past 30 years. The therapeutic proteins are produced in heterologous systems *in vitro* using recombinant DNA technology. Currently, new and better systems for expression are in development by implementing new plasmids, addition of genetic elements of the gene and further optimization of codons. Also, there are mutant strains which assimilate nutrients efficiently increasing the production of therapeutic recombinant proteins and/or reduce the production of toxic compounds that affect their production processes are also growing increasingly efficient to produce therapeutic proteins. The models used in industry are bacteria, yeast, insect cells and mammalian cells.

**Key words:** Recombinant proteins, biopharmaceuticals.

## De la farmacéutica a la biofarmacéutica

La biotecnología ha impactado el área de la medicina, principalmente con su contribución al conocimiento a nivel molecular de la causa de diversas enfermedades, lo cual ha generado una revolución en la industria farmacéutica con la producción de biofármacos contra enfermedades específicas.<sup>1,2</sup> Un biofármaco es una molécula biológica con fines terapéuticos obtenida a partir de un organismo vivo, ya sea a partir de bacterias, hongos, células animales, levaduras, entre otros. Estas moléculas presentan mayor acción terapéutica y menos reacciones secundarias, al ser prácticamente homólogas a las producidas por el organismo.<sup>3-5</sup> Esto se traduce en que el paciente en la actualidad puede acceder a tratamientos más eficaces y seguros. La gran mayoría de estos biofármacos son proteínas recombinantes.<sup>5</sup> La obtención de proteínas recombinantes se logra mediante la inserción del gen

---

\* Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

Dirección para correspondencia:  
Mauricio A. Trujillo-Roldán  
Unidad de Bioprosesos,  
Instituto de Investigaciones Biomédicas,  
Universidad Nacional Autónoma de México,  
AP. 70228, México, D.F., C.P. 04510, México  
Tel.: +52 55 56229192; fax: +52 5 6223369.  
E-mail: maurotru@gmail.com,  
maurotru@biomedicas.unam.mx

Recibido: 4 de agosto del 2009  
Aceptado con modificaciones: 5 de septiembre del 2009

que expresa la proteína de interés en un organismo diferente. La expresión de estas proteínas se ha convertido en una herramienta muy popular, ya que es posible obtener altas cantidades de proteína con bajos costos de producción y altas purezas de una o varias proteínas de interés.<sup>5</sup>

Un aspecto importante de estas proteínas de uso terapéutico es que son específicas contra padecimientos que antes se consideraban incurables, o bien cuando el medicamento existente sólo lograba controlar la enfermedad, en la mayoría de los casos de manera ineficaz. Un claro ejemplo de esto es el interferón-beta 1a y 1b, el cual ha elevado la calidad de vida de los pacientes diagnosticados con esclerosis múltiple.<sup>4,5</sup>

En diversos estudios se ha demostrado que la importancia de las proteínas terapéuticas recombinantes se ha incrementado exponencialmente en los últimos 30 años. En 2004 la industria biofarmacéutica era de alrededor de 45 mil millones y se prevé que pueda alcanzar más de 92 mil millones de dólares en el 2011, con un cubrimiento de más del 10% de toda la industria farmacéutica.<sup>6-8</sup> En la actualidad las grandes farmacéuticas tienen sus mayores ingresos de la venta de estos productos, por tanto la investigación en este rubro también ha aumentado en gran modo y el catálogo de biofármacos es cada vez mayor en tratamiento, curación, prevención o diagnóstico de enfermedades.

## Sistemas de expresión de proteínas recombinantes

La elección del microorganismo para expresar la proteína de interés depende en gran medida de las características fisicoquímicas de la proteína a producir. Los sistemas procariotes expresan proteínas solubles o en forma de agregados intracelulares o cuerpos de inclusión, sin plegamiento, lo que implica su estructuración *in-vitro*.<sup>2,9</sup> Los sistemas eucariotes 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.<sup>10</sup>

*Escherichia coli* es uno de los modelos más simples para la producción de proteínas recombinantes. En el mercado, cerca del 30% de las PT «sencillas» son producidas en *E. coli*, entre ellas algunas citoquinas, de

forma soluble o en forma de cuerpo de inclusión, con rendimientos de 20% de la proteína de interés frente a las proteínas totales.<sup>10-12</sup> El modelo de producción en *E. coli* alcanza los más altos niveles de productividad de proteína de interés, presentando grandes 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.<sup>11,13</sup> Algunas proteínas heterólogas expresadas en *E. coli* tienden a agregarse espontáneamente después de la acumulación de productos dentro de las células, formando cuerpos de inclusión y esta característica es aprovechada en producción.<sup>14-17</sup>

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.<sup>5</sup> En años recientes, cepas con baja producción de subproductos como ácidos orgánicos, se han vuelto populares por su capacidad de crecer en altas densidades y con altas productividades.<sup>5</sup>

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.<sup>18-22</sup> 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.<sup>10,23</sup> Sin embargo, los costos asociados a los medios de cultivo y adaptación de las células animales

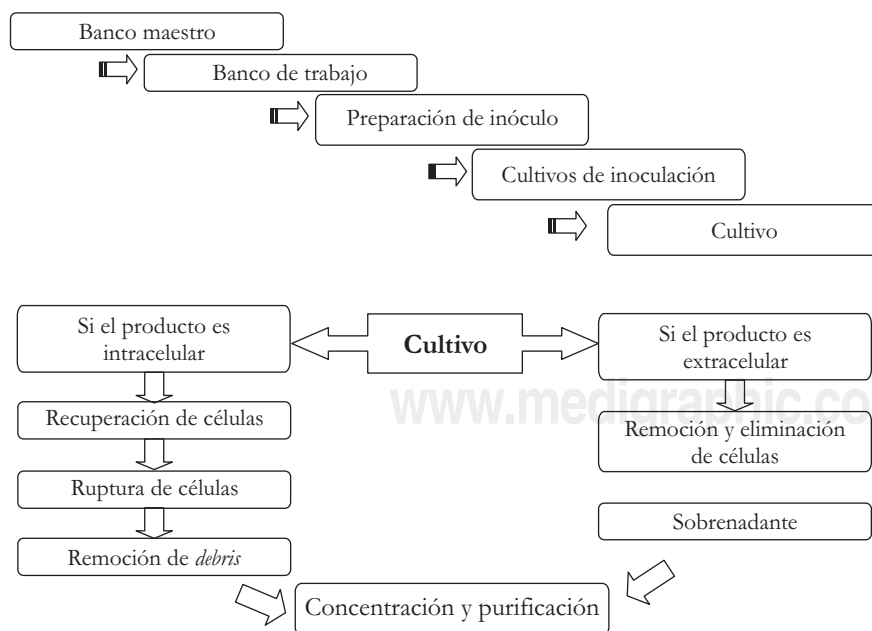
hacen de este sistema el más costoso para la producción de una proteína en especial. Un ejemplo típico es la producción de interferón beta 1a, donde hay dos tipos de interferón (IFN) beta recombinante: el IFN beta-1a y el IFN beta-1b. Este último producido por *E. coli* difiere del IFN beta humano en que posee una serina en lugar de una cisteína en la posición aminoacídica 17, carece de metionina N-terminal y no presenta glicosilación del residuo de asparagina en la posición 80. En contraste, el IFN beta-1a se produce en líneas celulares de mamífero, está glicosilado y es virtualmente igual a la proteína humana nativa.<sup>24</sup> Los dos IFN's beta contienen idénticas características físico-estructurales y físico-químicas; pero la actividad antiviral, anti-proliferativa e inmunomoduladora del IFN beta-1a es de 10 a 15 veces mayor que la del IFNbeta-1B.<sup>24</sup>

### Un acercamiento a un proceso de producción de proteínas terapéuticas recombinantes

Como se presenta en la *figura 1*, un proceso general de producción de proteínas recombinantes comienza con la selección e identificación del gen responsable de la producción de la proteína de interés. Después de la identificación y selección, se deben colocar en

plásmidos e insertarlos dentro del hospedero que puede ser una bacteria, levadura o célula animal.<sup>10</sup> Se deben aislar copias idénticas de las células transformadas y aquellas que producen la proteína de interés en mayores cantidades, son subcultivadas, colocadas en crio-viales, bajo buenas prácticas de fabricación y guardadas en sistemas refrigerados a -80 °C o en nitrógeno líquido y denominado como *banco maestro*.<sup>25</sup> Un vial de este banco maestro es subcultivado nuevamente para poder producir el *banco de trabajo* y de éste se utilizarán los viales para la producción. Normalmente, el banco maestro puede contener 100 viales y de cada uno potencialmente se puede generar un banco de trabajo de 100 viales cada uno. Si un vial es usado para un proceso o lote de producción, potencialmente se pueden realizar 10,000 lotes. Normalmente, una compañía puede llevar a cabo dos lotes de producción por semana, lo que implicaría que el banco maestro de la clona original alcanzaría para casi 100 años de producción. Por otra parte, los bancos deben ser muestreados continuamente para analizar la viabilidad, pureza e identidad celular, estabilidad genética (número de copias de plásmido, identidad e integración del plásmido) y fenotípica del cultivo, como también caracterizar el producto obtenido.<sup>25</sup>

Los procesos productivos actuales para manufacturar proteínas recombinantes de alto valor agrega-



**Figura 1.** Esquema general de un proceso de producción de proteínas recombinantes.

do, requieren ser altamente productivos, robustos y con bajos costos de producción.<sup>11,26</sup> Mientras algunas proteínas recombinantes necesitan producirse en grandes cantidades, como la insulina, de la que se planea una demanda de 16,000 kilogramos en 2012,<sup>27</sup> la mayoría de biofarmacéuticos son producidos en bajas cantidades (algunos kilogramos por año), por las cantidades necesarias para colmar la demanda mundial.<sup>6</sup> En la industria biofarmacéutica, parece ser que un par de miles de litros son los volúmenes más grandes a ser utilizados<sup>28</sup> y el volumen de cultivo está normalmente limitado a la estabilidad de la clona o a los fenómenos de transferencias de oxígeno y calor para mantener el cultivo en condiciones óptimas.<sup>10,29,30</sup>

En cuanto a la estabilidad de la clona, el hecho de que el número de plásmidos se vea disminuido a medida que incrementa la escala de producción, resulta en un decremento de la productividad y un aumento de los costos de producción.<sup>10</sup> Normalmente, se deben llevar estudios independientes del número mínimo de duplicaciones donde la productividad (o el número de plásmidos) se mantenga constante o al menos en los niveles mínimos para que la productividad no se vea afectada.<sup>16</sup>

Otro aspecto donde el volumen de cultivo puede verse afectado es por los niveles de expresión de las proteínas en los diferentes hospederos y la complejidad de las proteínas a ser expresadas. Si bien es cierto, *E. coli* presenta altas productividades de producción (del orden de 10–15 g/L de la proteína de interés), la complejidad de las proteínas que puede producir es baja.<sup>10-12</sup> Por otra parte, las células animales pueden producir proteínas de características complejas pero con muy bajos rendimientos de producción.<sup>10</sup>

Por otra parte, la purificación es un aspecto muy importante en la producción de productos recombinantes y normalmente es el más costoso. El objetivo de la purificación es obtener la mayor cantidad de producto con respecto al inicial, con el menor desperdicio posible y con la pureza exigida como mínima para el producto.<sup>10,11,16</sup> Así, en las operaciones y procesos de separación y purificación de los productos, estas etapas comprenden en forma general, separación de insolubles por filtración, centrifugación, o decantación, separaciones primarias por extracción, absorción, adsorción, ultrafiltración y purificación por extracción líquido-líquido, extracción a dos fases

acuosas, o cromatografía de afinidad y finalmente aislamiento del producto. En caso de proteínas terapéuticas, en el mayor de los casos, la pureza final debe ser mayor al 90%.<sup>31</sup> En el caso de que las proteínas sean producidas por el hospedero de manera intracelular, los cultivos son seguidos por una centrifugación con la finalidad de obtener la biomasa en forma de pasta celular, desechando el sobrenadante. Se obtiene el material intracelular por ruptura de las células mediante sistemas enzimáticos y/o mecánicos. Dependiendo de la naturaleza del producto se debe obtener el sobrenadante o el precipitado celular, esto en el caso de que las proteínas se produzcan como cuerpos de inclusión. Existen muchos métodos de purificación de proteínas recombinantes; sin embargo, los métodos cromatográficos son los más usados por su facilidad en escalamiento, reproducibilidad y fácil validación.<sup>16,31</sup>

A partir del uso de una maquinaria biológica para producir una proteína heteróloga, el cultivo en biorreactores y los diferentes pasos de purificación, es de vital importancia la caracterización analítica y bioquímica de las proteínas producidas,<sup>1,12,14,26</sup> ya que es de especial interés determinar y comprobar identidad molecular lote a lote. En farmacopeas se especifica la caracterización analítica de proteínas mediante la determinación de peso molecular por electroforesis en geles de poliacrilamida, determinación de punto isoeléctrico por isoelectroenfoque, separación y análisis de pureza por cromatografía líquida de alta resolución, determinación de isoformas por electroforesis capilar y/o mapeo peptídico, según cada proteína. Actualmente, la proteómica, se implementa para determinar similitudes entre biofármacos e identidad durante los procesos de producción, como la secuenciación de aminoácidos, fragmentación de aminoácidos por espectrometría de masas, así como la determinación de pesos moleculares y propiedades biofísicas.

## Perspectivas

La demanda de proteínas recombinantes terapéuticas de consumo humano se ha convertido en una realidad comercial y ha aumentado dramáticamente durante los últimos años, salvando un número incontable de vidas gracias a la casi accesibilidad ilimitada de

estas proteínas. Más de 80 proteínas recombinantes están aprobadas para consumo humano y al menos en 2008 se aprobaron 13 más de ellas. Además, existen más de 360 nuevas medicinas en desarrollo ([www.phrma.org](http://www.phrma.org)). Aunque mucho se ha avanzado, la producción de proteínas recombinantes constituye un campo que necesita ser mucho más estudiado, más aún cuando los precios de muchos de estos medica-

mentos son altos y de difícil acceso en países en vías de desarrollo.

Una de las estrategias que se deberá seguir debe estar encaminada a desarrollar nuevos procesos más eficientes y menos costosos de producción de proteínas terapéuticas idénticas a las aprobadas y que normalmente se conocen como biofármacos de segunda entrada (o biogénicos).

## Bibliografía

- Villaverde A, Mattanovich D. Recombinant protein production in the new Millennium. *Microb Cell Fact* 2007 20; 6: 33.
- Betton JM, Chaffotte A. Recombinant protein folding and production. *Med Sci (Paris)* 2005; 21(6-7): 613-617.
- Yang XM, Xu L, Eppstein L. Production of recombinant human interferon-alpha 1 by *Escherichia coli* using a computer-controlled cultivation process. *J Biotechnol* 1992; 23(3): 291-301.
- Maldonado LM, Hernández VE, Rivero EM et al. Optimization of culture conditions for a synthetic gene expression in *Escherichia coli* using response surface methodology: the case of human interferon beta. *Biomol Eng* 2007; 24(2): 217-222.
- Graumann K, Premstaller A. Manufacturing of recombinant therapeutic proteins in microbial systems. *Biotechnol J* 2006; 1(2): 164-186.
- Pavlou AK, Reichert JM. Recombinant protein therapeutics success rates, market trends and values to 2010. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 1513-1519.
- Datamonitor. Recombinant therapeutic proteins: Delivering a \$53 billion mature market by 2010. 2004 May 3.
- Parmar HC. Biopharmaceuticals market overview. *Pharmaceutical Technology Europe*. 1-3-2006.
- San KY, Bennett GN, Aristidou AA, Chou CH. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Ann N Y Acad Sci* 1994 2; 721: 257-267.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramírez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol* 2004; 267: 15-52.
- Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol* 1996; 14(3): 98-105.
- Sorensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 2005 26; 115(2): 113-128.
- Chou CP. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007; 76(3): 521-532.
- Ventura S, Villaverde A. Protein quality in bacterial inclusion bodies. *Trends Biotechnol* 2006; 24(4): 179-185.
- Rudolph R, Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J* 1996; 10(1): 49-56.
- Nuc P, Nuc K. Recombinant protein production in *Escherichia coli*. *Biochem* 2006; 52(4): 448-456.
- Ho JG, Middelberg AP. Estimating the potential refolding yield of recombinant proteins expressed as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng* 2004; 87(5): 584-592.
- Siegel RS, Brierley RA. Methylophilic yeast *Pichia pastoris* produced in high-cell-density fermentations with high cell yields as vehicle for recombinant protein production. *Biotechnol Bioeng* 1989; 34(3): 403-404.
- Ramon R, Feliu JX, Cos O, Montesinos JL, Berthet FX, Valero F. Improving the monitoring of methanol concentration during high cell density fermentation of *Pichia pastoris*. *Biotechnol Lett* 2004; 26(18): 1447-1452.
- Kong N, Mu X, Han H, Yan W. Pilot-scale fermentation, purification, and characterization of recombinant human Oncostatin M in *Pichia pastoris*. *Prot Express Purif* 2009; 63(2): 34-39.
- Hartner FS, Glieder A. Regulation of methanol utilization pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* 2006; 14: 5-39.
- Cregg JM, Cereghino JL, Shi J, Higgins DR. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 2000; 16(1): 23-52.
- Bleckwenn NA, Shiloach J. Large-scale cell culture. *Curr Protoc Immunol* 2004 May; App 1.
- Chofflon M. Recombinant human interferon beta in relapsing-remitting multiple sclerosis: a review of the major clinical trials. *Eur J Neurol* 2000; 7(4): 369-380.
- NewLab BioQuality AG. Cell line characterization. <http://www.newlab.de> 2009, May 20.
- Sodoyer R. Expression systems for the production of recombinant pharmaceuticals. *BioDrugs* 2004; 18(1): 51-62.
- Marcial GG. From symbiosis, a new kind of insulin. *Business Week* 13-8-2007.
- Singh V. Tech focus: Prognosticating the future of the bioreactor, specific demands will impact the ongoing evolution of this device. *GEN Gen Eng Biotech News* 2008; 28[2].
- Williams JA. Keys to a bioreactor selection. *Chem Eng Prog* 2002: 34-41.
- Park EY. Recent progress in microbial cultivation techniques. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2004; 90: 1-33.
- Smales CM. *Therapeutic proteins: methods and protocols*. Humana Press, 2005.