

# Ingeniería genética y biotecnología

JOSÉ LUIS GARCÍA

*Centro de Investigaciones Biológicas.  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas*

## 1. INTRODUCCIÓN

Si se acepta en un sentido amplio que la Biotecnología es «la tecnología aplicada a la utilización de los seres vivos o partes de éstos con fines prácticos o industriales», es indudable que la historia de la Farmacia constituye una parte significativa de la historia de la Biotecnología o viceversa. La mayoría de los medicamentos y principios activos que se han venido utilizando desde la antigüedad hasta el desarrollo de la moderna química orgánica procedían de los seres vivos. Incluso hoy en día muchos de los denominados compuestos «líderes», que sirven de base para la síntesis de los nuevos medicamentos se obtienen originalmente a partir de extractos de seres vivos. La denominada Biotecnología Tradicional ha sido en gran medida liderada por los sectores farmacéutico y agroalimentario y, por eso, no resulta sorprendente que las primeras aplicaciones y desarrollos de la Moderna Biotecnología surgieran en estos dos campos y, en particular, en el sector farmacéutico mejor desarrollado tecnológicamente.

Cuando a principios de la década de 1970 Cohen y colaboradores (1973) publicaron el primer experimento de Ingeniería Genética se produjo la señal de partida para una carrera tecnológica que alcanza su punto culminante en 1982 con la puesta en el mercado de la insulina humana recombinante (Andersen y Krummen, 2002). En apenas doce años se desarrollan las técnicas básicas de la Ingeniería Genéti-

ca que hoy en día constituyen el soporte de la Moderna Biotecnología y todo ello gracias a una industria farmacéutica muy potente que ve en la Biotecnología un área de expansión extraordinaria para producir nuevos medicamentos hasta entonces inabordables para los químicos orgánicos.

En este capítulo se pretende mostrar de forma panorámica lo que han supuesto y supondrán en el futuro las herramientas de la Ingeniería Genética y sus aplicaciones en el sector de la Biotecnología Farmacéutica. Unas breves pinceladas sobre las tecnologías servirán para conocer a los actores y el atrezo de esta historia, que no son otros que los seres vivos, y las herramientas y técnicas que utiliza la Ingeniería Genética. A continuación, se analizarán los usos de esta tecnología para producir fármacos de pequeño tamaño como por ejemplo, los antibióticos, los aminoácidos, o las vitaminas. Pero, por supuesto, la producción de macromoléculas con propiedades terapéuticas abanderará el desarrollo de este sector y a la que se dedicará buena parte del capítulo. La relevancia de las empresas de base biotecnológica dentro del sector farmacéutico merece una especial consideración sobre todo para intentar anticipar cual será su futuro más inmediato. Es evidente que el tamaño actual de este campo de estudio es tan grande que en el empeño se podrán quedar sin tratar en suficiente profundidad algunos aspectos que el lector puede sin duda considerar importantes, pero que probablemente podrá conocer con la ayuda de la bibliografía que al final del capítulo se aporta.

## **2. LOS ACTORES Y LAS HERRAMIENTAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA**

Para introducirse en el campo de la Ingeniería Genética y sus aplicaciones es importante estructurar la presentación, ya que de otra manera es muy fácil perderse a través de las distintas posibilidades que ofrece esta tecnología. Por ello, primero se analizarán los organismos susceptibles de ser modificados genéticamente que más se utilizan actualmente, para continuar con la descripción de algunas tecnologías básicas, y acabar con una panorámica de lo que se denomina ingeniería de los procesos biotecnológicos (Para una revisión de estas tecnologías ver Perera y col., 2002).

## 2.1. Los organismos

Hoy en día se puede afirmar que todos los seres vivos, desde los virus a los animales superiores pasando por las bacterias y las plantas, son susceptibles de modificación mediante Ingeniería Genética aunque no todos se utilizan con igual profusión en la industria farmacéutica.

### a) Virus

Los virus bacterianos (bacteriófagos o fagos) se utilizaron mucho en los comienzos de la Ingeniería Genética como herramientas (vectores) de clonación y expresión, si bien su uso actual se ha reducido a medida que se han desarrollado nuevos vectores plasmídicos (ver más adelante). Sin embargo, los virus animales siguen teniendo un papel relevante para el desarrollo de sistemas de expresión en células superiores y son herramientas de gran valor para el desarrollo de vacunas y para implementar las tecnologías de terapia génica.

### b) Bacterias

Las bacterias son los seres vivos más utilizados en los procesos biotecnológicos. Aunque son muchas las cepas bacterianas que se emplean en la actualidad, la enterobacteria *Escherichia coli* ocupa el primer lugar en la lista (Cornelis, 2000; Swartz, 2001). Prácticamente todos los procesos de Ingeniería Genética pasan por alguna etapa en la que interviene *E. coli*. Otros géneros bacterianos utilizados con cierta profusión son *Bacillus*, *Pseudomonas*, y los actinomicetos (*Streptomyces*, *Corynebacterium*, *Nocardia*).

### c) Levaduras y hongos

Las levaduras y los hongos son junto con las bacterias los sistemas que más se utilizan en Ingeniería Genética. El sistema de *Saccharomyces cerevisiae* se utiliza casi tanto como el de *E. coli* y no en vano fue por algo el primer genoma eucariota secuenciado completamente. Otras levaduras interesantes son *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces* y *Hansenula polymorpha*. La levadura *P. pastoris* se ha usado para producir grandes cantidades de proteínas, gracias a que es capaz de crecer en los reactores hasta alcanzar muy altas densidades celulares. Por ejemplo, se ha utilizado para producir quitinasa humana en cultivo continuo (0,3 g/L/día) o proinsulina humana en un sistema discontinuo (1,5 g/L) (Cereghino y col.,

2002). Entre los hongos es el *Aspergillus* en el que más se han desarrollado las herramientas genéticas aunque por su importancia en el campo de los antibióticos *Penicillium* ha recibido también mucha atención.

#### d) Plantas

Después de los microorganismos es en las plantas donde más desarrollos biotecnológicos aplicados se han llevado a cabo. En este caso el sistema modelo de trabajo es la *Arabidopsis thaliana*, una planta que no tiene interés agronómico ni industrial, y por eso los desarrollos productivos se realizan en plantas como tabaco, maíz, soja, algodón, arroz y muchas otras que producen beneficios agroindustriales de distintos tipos. Curiosamente aunque de las plantas se extraen numerosos principios activos casi todas las plantas transgénicas actuales se utilizan para obtener alimentos o productos de la industria manufacturera y son muy pocas las que se emplean como factorías para la producción de fármacos.

#### e) Animales

Aunque los animales transgénicos no se utilizan mucho como biofactorías, las células animales se cultivan en gran cantidad para la obtención de muchas proteínas de interés farmacéutico. El ratón, y la rata son los más utilizados como modelos transgénicos, si bien se han creado ovejas y cabras transgénicas para la producción en la leche de proteínas recombinantes. Las células de mamífero CHO (ovario de hámster chino) y las de mieloma murino SP2/0 y NS0 son las que más se utilizan para el cultivo, aunque también se emplean otras células animales como las BHK (células de riñón de hámster) y las FRhL-2 (células de mono), o humanas como las de origen linfoblastoide o fibroblastos diploides. Los sistemas bicistrónicos de expresión de genes acoplados a marcadores seleccionables y los sistemas de expresión regulados más o menos complejos combinados con los nuevos promotores que se están desarrollando para las células de mamífero ofrecen muchas posibilidades para la producción de proteínas que puedan resultar especialmente tóxicas para la célula productora. La posibilidad de clonar y sobreexpresar genes de glicosiltransferasas (*e. g.*, galactosiltransferasa, sialiltransferasa, *N*-acetilglucosaminiltransferasa III) es una opción interesante, y en muchos casos clave, para la correcta glicosilación de las proteínas de uso terapéutico. Las nuevas tecnologías de clonación de células animales abren muchas posibilidades no tanto para obtener animales transgénicos, para

lo que compiten con las opciones convencionales, sino para obtener células madre para uso terapéutico en trasplantes. En el mismo sector de actividad se encuentran el desarrollo de tejidos *in vitro* y la producción de órganos animales humanizados para xenotrasplantes.

## 2.2. Las herramientas y técnicas

Son muchas y muy variadas las técnicas y herramientas que se utilizan en la Ingeniería Genética y, por supuesto, será imposible describir las todas aquí, pero el conocimiento de las más importantes puede ayudar a comprender mejor cómo se realiza el trabajo con esta tecnología.

### a) Enzimas.

Las enzimas son las herramientas más utilizadas en Ingeniería Genética y, dentro de estas, las más empleadas son las enzimas de restricción (endonucleasas) que reconocen secuencias específicas de nucleótidos del ADN y producen la rotura de las dos cadenas. Tras la rotura del ADN en pequeños fragmentos, las ADN ligasas son las que catalizan la unión de estos fragmentos y propician así la recombinación genética *in vitro*. Otras enzimas como polimerasas, nucleasas, fosfatasa, etc., completan la gran colección de opciones que permiten al ingeniero manipular *in vitro* el ADN. La fuente de estas enzimas es muy diversa y alcanza a todos los seres vivos, si bien la mayoría proceden de microorganismos, muchos de ellos recombinantes.

### b) Vectores.

Se denominan vectores a las cadenas de ADN o ARN extracromosómicas que se utilizan para transportar información genética. Los más utilizados son los plásmidos, moléculas de ADN generalmente circulares y de pequeño tamaño en torno a las 5 Kb (5000 pares de bases) de media. Como ya se ha comentado, los virus animales y bacterianos se utilizan también como vectores. Los vectores pueden ser de múltiples tipos en función de la utilidad que se les asigne. Algunos sólo sirven como portadores de la información (vectores de clonaje), pero los más interesantes son los denominados vectores de expresión, que portan secuencias promotoras, que permiten sintetizar grandes cantidades de proteínas a partir del gen o genes clonados en el vector. El número de vectores dispo-

nibles en el mercado es enorme y cada día son más lo que se venden en forma de «kits» listos para su uso con una simple receta o protocolo, lo que facilita enormemente el trabajo de clonación y expresión de genes.

c) Técnicas de transformación genética.

Una vez que se ha obtenido un vector que porta una molécula de ADN o ARN recombinante es necesario introducirlo en la célula huésped, que actuará como sistema de almacenamiento o expresión de la información. Para esto se han desarrollado múltiples sistemas de transformación genética. En los microorganismos y células aisladas, la transformación a veces se hace mediante procesos naturales como la infección viral, la conjugación o la competencia natural (capacidad natural de internalizar moléculas de ADN), pero lo habitual es hacerlo mediante procesos artificiales, ya sean químicos (sales, polímeros), bioquímicos (enzimas), físicos (electroporación), o mediante combinaciones de éstos. Las plantas se transforman generalmente mediante técnicas de infección (viral o bacteriana) o por sistemas biolísticos utilizando las denominadas pistolas o cañones de genes. Para la obtención de animales transgénicos, los embriones se transforman mediante microinyección o se crean mediante técnicas mucho más complejas embriones clónicos, como en el famoso caso de la oveja Dolly. Por último, hay que señalar que después del proceso de transformación se requiere un periodo de adaptación y crecimiento del organismo transformado que si bien en los microorganismos es por lo general muy sencillo, en las plantas y, por supuesto, en los animales es muy complejo.

d) Amplificación del ADN.

Si hubiera que poner la medalla de honor a una herramienta de la Ingeniería Genética tal vez ésta le correspondería a la técnica denominada PCR (*polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa). Esta herramienta permite copiar millones de veces (amplificar) el ADN o el ARN gracias a la acción conjunta de una polimerasa termoestable y dos oligonucleótidos (cebadores o *primers*) que se anillan en ambos extremos de un fragmento de ADN que se quiere copiar. Mediante esta herramienta es posible extraer la información genética del cromosoma de un ser vivo para colocarla después en un vector y poder así expresarla en cualquier célula huésped. Esta tecnología, entre otras muchas cosas, permite realizar con gran sencillez procesos de mutagénesis al azar o dirigi-

da, que son de una gran utilidad para el desarrollo de los procesos biotecnológicos. Para realizar la PCR existen en el mercado múltiples tipos de equipos automáticos denominados termocicladores y un gran número de polimerasas termoestables.

*e)* Secuenciación del ADN.

La secuenciación del ADN es un proceso clave en el desarrollo de la Ingeniería Genética, ya que permite conocer la estructura primaria de los genes y de ello deducir la secuencia de aminoácidos de las proteínas. Aunque no es imprescindible conocer la secuencia de un gen para poder obtener organismos recombinantes de interés industrial, hoy en día gracias a la facilidad que ofrecen los secuenciadores automáticos de ADN se trabaja siempre conociendo la secuencia del gen o del fragmento de ADN que se está manipulando. La secuenciación completa de muchos genomas, entre ellos los de *Saccharomyces*, *E. coli*, y sobre todo la secuenciación del genoma humano, ha abierto las puertas a numerosos desarrollos biotecnológicos.

*f)* Ingeniería de proteínas e ingeniería metabólica.

Cuando la Ingeniería Genética se aplica a la modificación de las proteínas se utiliza el término de ingeniería de proteínas (Ogawa y Shimizu, 1999). De la misma manera, cuando de lo que se trata es de modificar un proceso metabólico se emplea el término de ingeniería metabólica (Chartrain y col., 2000; Stafford y Stephanopoulos, 2001). Las herramientas de la ingeniería de proteínas y de la metabólica se han desarrollado no sólo para ampliar el conocimiento de la Bioquímica, sino que hoy en día mediante estas herramientas se optimizan muchos procesos biocatalíticos para producir compuestos de interés químico y sobre todo farmacéutico, como se verá más adelante (Nielsen, 1998). Junto con estas herramientas se han desarrollado nuevos conceptos y metodologías, como la evolución dirigida o la genética combinatorial en sus distintas versiones, que pretenden conseguir nuevas formas de proteínas o de sistemas metabólicos mediante la inclusión al azar en un organismo de distintos genes o librerías génicas (biblioteca o conjunto de genes clonados en un vector). La posterior selección del organismo recombinante mediante el empleo de sistemas robotizados de cribado masivo de muestras (*high-throughput screening*) permite obtener en poco tiempo la proteína o el organismo deseado.

g) Genómica y proteómica.

La secuenciación completa de algunos genomas ha permitido desarrollar una nueva herramienta para la Ingeniería Genética denominada ADN-chips (*microarrays*), que permite analizar en una sola etapa la expresión o la composición de un genoma. Aunque existen muchos dispositivos de ADN-chips y varias tecnologías para construirlos, básicamente lo que todos ellos contienen son fragmentos de ADN (oligonucleótidos o genes) ordenados en forma matricial, que representan a cada uno de los genes de un genoma. Mediante marcaje del ARN o del ADN extraído de un organismo y su posterior hibridación con el ADN-chip se puede saber qué genes están activos (transcriptoma) o qué genes están mutados en una determinada célula. Por otro lado, las técnicas de electroforesis bidimensional de proteínas junto con los nuevos sistemas de espectrometría de masas aplicados a las proteínas permiten obtener una visión panorámica de la composición proteica de una célula en un determinado momento de su desarrollo (proteoma). El análisis del genoma, del transcriptoma, y del proteoma permiten conocer de una forma más precisa cómo se desarrolla el metabolismo celular y como consecuencia de ello aplicar la Ingeniería Genética de forma más racional para conseguir mejorar la producción de fármacos. Si a todo esto se unen las nuevas tecnologías para el análisis de metabolitos (metaboloma) es fácil hacerse una idea del gran futuro que se abre para el desarrollo farmacéutico.

### 2.3. Los biorreactores

Para que todos los sistemas desarrollados por Ingeniería Genética se puedan llevar a la práctica es necesario plasmarlos en procesos de producción y esto conlleva el desarrollo de biorreactores de uno u otro tipo (Chu y Robinson, 2001). Los biorreactores son equipos de distinta complejidad técnica, según su función, en los que se lleva a cabo un proceso biológico que puede ir desde el cultivo de un organismo hasta el desarrollo de una reacción de biotransformación (biocatálisis). El diseño del biorreactor se hace casi siempre a la carta puesto que el ingeniero trata de optimizar el proceso acoplándolo a las características del organismo o la enzima. Los reactores que se utilizan hoy en día se distribuyen en un rango de capacidad muy amplio, desde cientos de metros cúbicos para



los cultivos microbianos más grandes como son los sistemas de producción de antibióticos y aminoácidos, hasta botellas de no más de un litro de capacidad para la producción de proteínas en cultivos de células de mamífero.

Con ser importante el diseño del reactor para la producción de una sustancia farmacéutica no lo es menos el proceso de aislamiento y purificación del producto final. La combinación de técnicas físico-químicas y bioquímicas como la centrifugación, extracción, filtración, precipitación, cromatografía, cristalización, etc., permite la obtención de pequeñas moléculas como los antibióticos hasta grandes moléculas como las proteínas con un altísimo grado de pureza y sobre todo con un coste razonable para facilitar su posterior comercialización.

### 3. LAS PEQUEÑAS MOLÉCULAS

La industria farmacéutica se nutre fundamentalmente de pequeñas moléculas que en su mayoría sintetizan los químicos orgánicos. Sin embargo, cada vez son más las pequeñas moléculas que se obtienen mediante procesos biotecnológicos, ya sea por fermentación o por procesos de bio-transformación (Demain, 2000; Dordick y cols., 1998).

#### 3.1. Procesos fermentativos

Los procesos fermentativos han sido y son una fuente importante de obtención de fármacos. Aunque en general estos procesos son muy complejos y se dispone de una limitada información sobre las rutas metabólicas, poco a poco se van conociendo mejor gracias a las nuevas tecnologías de la Ingeniería Genética (Hashimoto y Ozaki, 1999).

##### 3.1.1. Antibióticos

Los antibióticos se producen como metabolitos secundarios en muchos microorganismos, pero fundamentalmente en hongos (*Penicillium*, *Cephalosporium*), y bacterias (*Streptomyces*, *Bacillus*) (Allsop, 1998).

Actualmente, se conocen unos 12.000 antibióticos diferentes aunque sólo se usan en terapéutica unos 150, con un mercado que supera los 20.000 M€. Muchos de estos antibióticos se descubrieron en los últimos 20 años gracias a enormes programas de cribado (*screening*) de muestras de diferente origen, pero actualmente las nuevas tecnologías genómicas están permitiendo realizar una aproximación más racional al diseño de nuevos antibióticos. La genética o biosíntesis combinatorial y el ADN-*suffling* (barajado del ADN) se están utilizando para intercambiar genes del metabolismo secundario entre microorganismos productores de antibióticos o para crear genes híbridos de enzimas clave en el metabolismo que permitan la síntesis de nuevas moléculas antibióticas (Rodríguez y McDaniel, 2001). Especialmente significativos son los estudios de Biología Molecular realizados para conocer los procesos de síntesis de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos (Martín y Demain, 2002; Peñalva y cols., 1998). En este sentido, también ha sido particularmente productiva la síntesis de nuevos antibióticos poliketidos a través de la creación de poliketido sintetasas híbridas y/o mutantes. Este proceso combinado con la posibilidad de modificar las rutas de biosíntesis de los azúcares ha permitido crear nuevas moléculas de antibióticos macrólidos de reconocida importancia clínica. Desde que en la década de 1980 se demostró que algunas rutas biosintéticas de antibióticos estaban organizadas en bloques de genes (*clusters*), y que era posible transferirlas de un organismo productor a otro no productor se han llevado a cabo muchos avances en la clonación y modificación de rutas de biosíntesis de antibióticos, tanto en bacterias como en hongos. Incluso hoy en día se han desarrollado métodos para extraer la información genética de microorganismos productores de antibióticos directamente de muestras de suelo, con objeto de clonar los genes de microorganismos que serían difíciles de aislar y cultivar.

Aunque la cefalosporina C se produce directamente por fermentación, muchas de las cefalosporinas del mercado derivadas de ella se producen a partir de la expansión química del anillo del ácido 6-aminopenicilánico (6APA) para convertirlo en ácido 7-aminodesacetoxicefalosporánico (7ADCA). Esto se debe a que los rendimientos en la fermentación de las penicilinas G y V en *Penicillium* son mayores que los rendimientos en cefalosporina C y a que el 7ADCA no se puede obtener fácilmente a partir de la cefalosporina C. Por ello se ha modificado el *Penicillium* para producir desacetoxicefalosporina C clonándole los genes de la epimera-

sa y la expandasa. Más aún, añadiendo ácido adípico al caldo de cultivo es posible producir adipil-7ADCA gracias a la acción concertada de la aciltransferasa del propio *Penicillium* que convierte la isopenicilina N en adipil-6APA y de la expandasa de *Streptomyces clavuligerus* clonada en *P. chrysogenum*. Por otro lado, cuando se expresan en *P. chrysogenum* la aciltransferasa y la expandasa/hidroxilasa de *Cephalosporium* lo que se obtiene es adipil-7aminocefalosporánico (adipil-7ACA). El adipil-7ADCA y el adipil-7ACA pueden utilizarse directamente para producir 7ADCA y 7ACA gracias a un proceso de biotransformación en una sola etapa utilizando una enzima con actividad adipilacilasa (ver más adelante).

### 3.1.2. Vitaminas

La producción de vitaminas y de precursores de vitaminas también se está beneficiando de los avances en ingeniería metabólica. Los microorganismos se emplean en la producción de biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, piridoxal,  $\beta$ -caroteno (provitamina A), tiamina ( $B_1$ ), riboflavina ( $B_2$ ), vitamina  $B_6$ , vitamina  $B_{12}$ , y ergosterol (provitamina  $D_2$ ). Como ejemplo del potencial de la tecnología recombinante se ha conseguido llevar a cabo la síntesis de licopeno,  $\beta$ -caroteno, y astaxantina en la levadura *Candida utilis* tras la clonación de algunos genes de las bacterias *Erwinia uredova* y *Agrobacterium aurantiacum*. También mediante la aplicación de la Ingeniería Genética se pueden producir  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, o astaxantina en células de *E. coli* recombinantes. En *B. subtilis* se ha maximizado la producción de riboflavina (vitamina  $B_2$ ) hasta alcanzar los 30 g/L utilizando mutagénesis y sobreexpresión de algunos genes de la ruta biosintética. Ciertas cepas de *Serratia marcescens* obtenidas por mutagénesis, selección para resistencia a antimetabolitos de biotina, y clonación de genes específicos de la síntesis de biotina producen hasta 600 mg/L de esta vitamina en presencia de altas concentraciones de azufre y hierro. La conversión de sorbitol a ácido 2-ceto-L-gulónico, precursor de la vitamina C, se puede incrementar mediante la sobreexpresión en la bacteria *Gluconobacter oxydans* de la L-sorbosa deshidrogenasa y la L-sorbosona deshidrogenasa junto con la creación de una mutación que bloquea la degradación del ácido 2-ceto-L-gulónico (Hancock y Roberto, 2002).

### 3.1.3. *Aminoácidos*

El mercado mundial de los aminoácidos es enorme y de alguno de ellos se alcanzan cifras muy alevadas de venta (*e. g.*, 915 M€ para el L-glutamato, 450 M€ para la L-lisina, 198 M€ para la L-fenilalanina, y 43 M€ para el L-aspartato). Muchos aminoácidos y especialmente los que se utilizan en grandes cantidades en la industria agroalimentaria y farmacéutica se obtienen directamente mediante la fermentación de microorganismos. La combinación de las técnicas clásicas de mutagénesis con las de ingeniería metabólica están permitiendo aumentar mucho los niveles de producción de las cepas salvajes. Por ejemplo, el efecto de la amplificación génica junto con la desregulación de enzimas claves de las rutas biosintéticas ha servido para aumentar la producción del L-triptófano en cepas recombinantes de *Corynebacterium glutamicum*. Por otro lado, eliminando la homoserina deshidrogenasa, se puede convertir una cepa salvaje de *Corynebacterium*, productora de glutamato, en una cepa hiperproductora de L-lisina. Si además se incrementa la resistencia a la retroinhibición de dos enzimas claves de la ruta de biosíntesis de la L-lisina, como son la aspartato kinasa y la dihidrodipicolinato sintetasa, se consiguen producciones de hasta 120 g/L de L-lisina con un rendimiento de 0,25-0,35 moles de este aminoácido por cada mol de glucosa utilizada en la fermentación.

## 3.2. **Procesos de biotransformación**

La necesidad de la industria farmacéutica de obtener moléculas quirales cada vez más complejas ha propiciado el desarrollo de nuevos procesos de biocatálisis o biotransformación combinados con nuevas tecnologías de ingeniería bioquímica (Tabla 1) (Huisman y Gray, 2002; Straathof y cols., 2002). Las enzimas son excelentes catalizadores en las reacciones regio- y estéreo-selectivas en condiciones suaves (Kirk y cols., 2002; Schmid y cols., 2002). Además, pueden aceptar como sustratos muchos compuestos artificiales. Aunque el uso de las enzimas en los procesos de síntesis asimétrica, o lo que es lo mismo, en procesos de biocatálisis se describió a finales del siglo XIX no fue hasta la década de 1970 cuando éstas comenzaron a utilizarse industrialmente coincidiendo con la posibilidad de obtenerlas mediante Ingeniería Genética en grandes cantidades y a bajo coste.

TABLA 1  
Algunos productos que se obtienen por biotransformación

Producto	Sustrato	Enzimas
(S)-2-Cloropropiónico	2-Cloropropiónico racémico	Células enteras, deshalogenasa (S)- específica
Alcoholes enantiopuros	Alcoholes racémicos	Lipasas
Aminas quirales	Aminas racémicas	Lipasas
(R)-Mandélico	Cianhidras racémicas	Nitrilasa
(R)-2-(4-Hidroxifenoxi)-propiónico	(R)-2-fenoxipropiónico	Células enteras, oxidasa
L- o D-Aminoácidos	Lactamas, éteres racémicos N-protectidos	Lactamasas
D-Aminoácidos	Aminoácidos N-acilados racémicos	D-Aminoacilasa
L-Aminoácidos	Aminoácidos N-acetilados racémicos	N-Acetil-L-aminoácido amidohidrolasa (aminoacilasa)
4-Endo-hidroxi-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-ona	Éster de 4-Hidroxi-2-oxabicyclo[3.3.0]oct-7-en-3-ona butirato	Triacilglicerol acilhidrolasa
(S)-Éster amidas	Aralactonas racémicas	Triacilglicerol acilhidrolasa inmovilizada (triacilglicerol lipasa)
L-Aminoácidos	Aminoácidos racémicos N-acetilados	L-Acilasas
D-Aminoácidos	Hidantoinas racémicas	Hidantoinasas, descarbamilasas, racemasa
L-Tert-leucina	Trimetil piruvato	Leucina deshidrogenasa
(2R,3S)-3-(p-Metoxifenil)glicidil metil-éster	Trans-3-(p-metoxifenil) glicidil metiléster racémico	Lipasa
L-Aminoácidos	Derivados de aminoácidos racémico	Amidasas, esterasas, proteasas
D-Aminoácidos	Hidantoinas racémicas	Hidantoinas, descarbamilasa
L-Aspártico	Fumárico	Amoniolasa
Aspartamo	L-aspártico N-Protectido, D/L-fenilalanina metil éster	Termolisina
Cianhidras enantioméricamente puras	Aldehídos	Hidroxi-nitrilolasa
6-APA, 7-ADCA	Penicilina G o V	Penicilinasclasa G o V
Antibióticos β-lactámicos	7-ADCA o 6-APA y ácidos derivados	Acilasas
Niacinamida	Nicotinonitrilo	Células enteras inmovilizadas, nitrilo hidratasa
2-Piridinamida, pirazinamida	Nitrilos	Células enteras, nitrilo hidratasa
(S)-Pipécólico, (R)- y (S)-piperazínico	Amidas racémicas	Células enteras, (R)- y (S)-amidasas
(S)-2-Fenil-propiónico	2- Fenilpropionitrilo racémico	Células enteras, nitrilo hidratasa, amidasa
L-Camitina	4-Trimetilamino butirato	Células enteras, desaturasa, hidratasa
Derivados hidroxilados en el anillo de piridina y pirazina	Derivados de piridina y pirazina	Células enteras, nitrilasas, deshidrogenasas
5-Metil-pirazina-2-carboxílico	2,5-Dimetilpirazina	Células enteras, ruta de degradación de xileno
7-ACA	Cefalosporina C	D-Aminoácido oxidasa y glutarilacilasa
(S)-Epoxtiestireno	Estireno	Células enteras, estireno hidroxilasa

Por biotransformación o biocatálisis se entiende todo proceso por el que una sustancia se transforma en otra mediante una reacción o conjunto de reacciones bioquímicas. Si bien la fermentación se puede considerar como un proceso de biotransformación complejo, en este apartado se van a tratar sólo aquellos procesos en los que intervienen un número pequeño de reacciones. Obviamente, en el extremo de la simplicidad se encuentran los procesos biocatalíticos en los que sólo interviene una enzima. Estos procesos pueden desarrollarse *in vivo* o *in vitro* con células o enzimas libres o inmovilizadas. A su vez, en los procesos *in vivo* pueden utilizarse células en crecimiento o células en reposo (*resting cells*). El que se utilicen enzimas purificadas o los organismos completos en el proceso de conversión depende en gran medida del requerimiento de cofactores enzimáticos que necesiten ser regenerados. La regeneración *in vitro* de los cofactores es cara y compleja y en esos casos se utilizan los organismos completos.

La hidrólisis estereoespecífica de un compuesto racémico es una de las herramientas que más se utilizan en procesos de biotransformación para obtener compuestos quirales puros. El rendimiento teórico de este proceso es del 50% pero mediante la combinación de racemasas e hidrolasas estereoespecíficas se pueden producir con altos rendimientos muchos compuestos quirales a partir de mezclas racémicas, ya que mediante la racemasa el enantiómero no hidrolizado es racemizado para volver a ser hidrolizado de nuevo. A veces, para conseguir estos fines se pueden también combinar la catálisis química y la biocatálisis. Por ejemplo, las lipasas catalizan la hidrólisis o síntesis enantioselectiva de ésteres racémicos y se utilizan para la obtención de alcoholes o ésteres quirales. El éster enantiomérico no hidrolizado o no utilizado en la síntesis puede ser racemizado mediante catálisis química con un catalizador de rutenio o paladio.

En el caso de los aminoácidos, en algunas ocasiones se pretende obtener la forma L pero otras veces interesa la forma D, e incluso puede ser necesario obtener aminoácidos no naturales para la síntesis de peptidomiméticos de interés clínico como los que se emplean para inhibir proteasas como la trombina, la proteasa del VIH, o la enzima convertidora de la angiotensina. Los D-aminoácidos, como D-alanina, D-glutámico, y D-prolina, utilizados en la síntesis de fármacos se producen a partir de

sus amidas racémicas utilizando amidasas estereoespecíficas. Mediante clonaje de los genes de tres enzimas de diferentes organismos (L-aminoácido desaminasa de *Proteus myxofaciens*, D-aminoácido aminotransferasa de *Bacillus sphaericus*, y alanina racemasa de *Salmonella typhimurium*) se ha producido en *Escherichia coli* D-fenilalanina, D-tirosina, D-triptofano, y D-leucina a partir de sus respectivos L-isómeros. Los L-aminoácidos además de por fermentación directa se pueden obtener por biotransformación, y un ejemplo de ello es el uso de la *Pseudomonas putida* para obtener L-cisteína a partir de D,L-amino-(2-tiazolina-4-carboxilato por acción de una tiazolina carboxilato racemasa y una hidrolasa L-específica. El ácido D-pantoténico (una vitamina utilizada como aditivo alimentario) se produce a partir de D,L-pantoteil-lactona mediante una hidrólisis estereo-específica realizada con el hongo *Fusarium oxysporum*.

Ya se ha comentado que algunas de las enzimas que se utilizan en procesos biocatalíticos, como oxigenasas y reductasas, requieren cofactores (e. g., NADH) que han de ser regenerados *in situ* porque tienen un alto coste y su consumo sin regeneración haría que el proceso no sea rentable. El reciclado del cofactor se suele hacer utilizando la ayuda de una enzima ya sea *in vivo* o *in vitro*. Los primeros procesos de biotransformación en los que se utilizaba la regeneración de cofactores se describieron en la década de 1980 para la aminación reductiva del 2-oxo-4-metilpentanoico a L-leucina con L-leucina deshidrogenasa. En este proceso el cofactor NAD unido a PEG se reciclaba con formiato y formiato deshidrogenasa de la levadura *Candida boidinii*. También se usa para este fin la glucosa deshidrogenasa. Un sistema alternativo para el reciclado de NADPH por fotorreducción se ha descrito para la síntesis de L-glutamato a partir del ácido 2-oxoglutarico y amoniaco.

Algunos de los ejemplos más interesantes de los procesos de biotransformación se encuentran en el campo de la producción de esteroides. Se ha conseguido clonando genes humanos, bovinos y de plantas producir en *Saccharomyces cerevisiae* pregnenolona y progesterona a partir de galactosa. Hasta entonces la síntesis de estos esteroides se hacía mediante una combinación de síntesis química y biotransformación empleando precursores como colesterol y fitosteroides.

Los oligosacáridos son productos de mucho interés farmacéutico pero difíciles de obtener por síntesis química. La polimerización de azúcares transcurre *in vivo* por la adición sucesiva de moléculas del tipo de la UDP-glu-



cosa o la UDP-galactosa. Se están desarrollando sistemas para la síntesis de UDP-glucosa a gran escala utilizando hexokinasa, fosfoglucomutasa y UDP-glucosa pirofosforilasa. A pequeña escala, se ha integrado la regeneración de UDP-galactosa con la síntesis de trisacáridos utilizando *Corynebacterium ammoniagenes* y un recombinante de *E. coli*. Los productos de partida son ácido orótico, glucosa, fructosa y galactosa. El uridin-trifosfato (UTP) necesario en este proceso se sintetiza en *C. ammoniagenes* a partir del ácido orótico para que, posteriormente, sea transformado en UDP-galactosa por el recombinante de *E. coli* que expresa los genes *galT*, *galK* y *galU*. Cuando además en *E. coli* se expresa una 1,4-galactosiltransferasa, la UDP-galactosa se puede acoplar con la lactosa para producir el oligosacárido globotriosa. Éste es uno de los sistemas más complejos de biotransformación que puedan ser diseñados, ya que se requieren sistemas de regeneración de ATP y UDP y, además, hay que mantener las células permeabilizadas para facilitar la salida y entrada de los nucleótidos en el sistema.

La pravastatina, un fármaco utilizado para disminuir los niveles de colesterol, es uno de los más vendidos en el mundo. La pravastatina se produce por oxidación microbiana de la compactina producida por fermentación mediante un proceso que implica el uso de dos microorganismos: *Penicillium citrinum* para la producción de compactina y *Streptomyces carbophilus* para la oxidación regio- y estéreo-específica de la compactina. Como este proceso no es muy eficiente se ha creado un recombinante de *Penicillium* en el que se ha clonado y expresado el gen de la citocromo P450 monooxigenasa de *Streptomyces* necesaria para la oxidación de la compactina, lo que permite la producción de pravastatina en un único paso.

Uno de los procesos más utilizados de biotransformación a escala industrial es la cascada enzimática formada por la hidantoinasa, la N-carbamoilasa y la hidantoína racemasa, que sirve para obtener D- y L-aminoácidos naturales y no naturales a partir de hidantoínas sintéticas (Figura 1) (Altenbuchner y cols. 2001). Teóricamente, se puede lograr el 100% de conversión en un 100% de aminoácido ópticamente puro a partir de una mezcla racémica. El empleo de las técnicas de evolución dirigida de proteínas, la elucidación de las estructuras de las enzimas, y el empleo de proteínas de fusión han permitido mejorar las enzimas de este proceso.

Las pencilinacilasas (también denominadas penicilinesterasas o penicilinamidases) son una familia de enzimas que se encuentran ampliamente



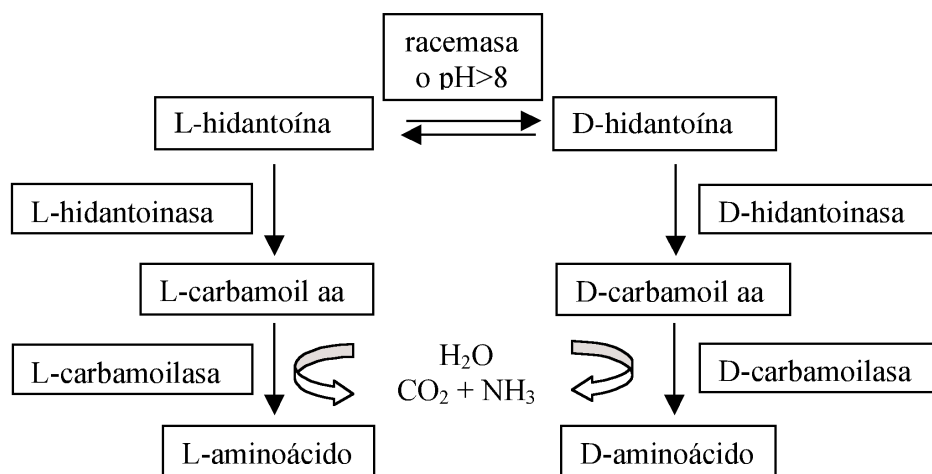


FIGURA 1. Esquema de biotransformación de *D,L*-hidantoínas en *D,L*-aminoácidos.

distribuidas en la naturaleza y se utilizan desde hace tiempo en la industria de los antibióticos  $\beta$ -lactámicos para obtener 6APA por hidrólisis de las penicilinas G o V. También se emplean para obtener 7ADCA por hidrólisis del producto que resulta después de expandir químicamente el anillo de la penicilina. Una combinación de D-aminoácido oxidasa y glutaril-acilasa se emplea para producir 7ACA a partir de la cefalosporina C. Recientemente, estas acilasas se han utilizado para sintetizar antibióticos, ya que en determinadas condiciones también las enzimas pueden catalizar la reacción inversa con buenos rendimientos. De esta forma se consiguen las penicilinas «verdes» o ecológicas, denominadas así porque en su producción ya no se emplean los procesos químicos más contaminantes. Desde hace tiempo, los genes de estas enzimas se han clonado y manipulado no sólo para mejorar su producción sino para obtener enzimas más eficaces tanto para la hidrólisis como para la síntesis.

#### 4. LAS MACROMOLÉCULAS

Aunque en la actualidad se encuentran en uso clínico algo menos de un centenar de productos biofarmacéuticos, se calcula que más de 60 millones de personas se han beneficiado ya de estos productos, que alcan-

zan un mercado global de unos 12.000 M€ (Walsh, 2000). Ese mercado está en continuo crecimiento y se estima que aproximadamente 500 productos se encuentran en ensayos clínicos. La mayoría de ellos se destinan al cáncer y a las enfermedades cardiovasculares e infecciosas. Aunque en principio muchos de estos productos imitaban a los compuestos naturales, cada vez son más aquéllos en los que se introducen mutaciones por ingeniería de proteínas para mejorar su eficacia terapéutica. Casi todos los productos son proteínas aunque poco a poco van a empezar a comercializarse productos basados en ácidos nucleicos, como vacunas ADN, oligonucleótidos antisentido y ribozimas.

#### 4.1. Proteínas

La Ingeniería Genética ha proporcionado al menos tres grandes ventajas en la producción de proteínas de interés farmacéutico, ya que no sólo ha supuesto una forma de solucionar los problemas de la disponibilidad y de la seguridad de la fuente sino que también ha facilitado la posibilidad de modificar el nuevo fármaco mediante ingeniería de proteínas (Andersen y Krummen, 2002). El tratamiento del enanismo mediante la administración de hormona de crecimiento humana extraída de pituitarias humanas sufrió un duro revés en 1985 cuando se descubrió que producía la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob debido a la contaminación con priones. El problema causado por la presencia de virus en los preparados de proteínas derivadas de la sangre fue otro de los factores que impulsaron el desarrollo de las proteínas a partir de organismos recombinantes.

##### 4.1.1. *Hormonas y factores de crecimiento*

La insulina humana ha sido la primera proteína recombinante que se ha comercializado. En 1982 la compañía Eli Lilly produjo las dos cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la insulina humana en *E. coli* (Tabla 2). Cada cadena de la insulina se produjo en forma de producto de fusión con la  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* utilizando dos fragmentos de ADN sintéticos codificantes de ambas cadenas. Cada cadena de la insulina se separaba de la proteína de fusión mediante una hidrólisis con BrCN. La formación posterior de los puentes

TABLA 2  
Hormonas y factores de crecimiento de origen recombinante

Proteína	Utilidad Terapéutica	Nombre comercial (compañía)	Sistema de protección	Año
Insulina	Diabetes	Humulin (Eli Lilly) Insuman (Hoechst AG)	<i>E. coli</i>	1982
Insulina	Diabetes	Novolin (Novo Nordisk)	<i>S. cerevisiae</i>	1991
Insulina Lispro	Diabetes	Humalog (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	1996
Insulina Biolysprol	Diabetes	Liprotol (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	1997
Insulina Aspart	Diabetes	NovoRapid (Novo Nordisk)	<i>S. cerevisiae</i>	1999
Insulina Glargine	Diabetes	Lantus (Aventis)	<i>E. coli</i>	2000
Hormona de crecimiento humana (hGH) (metionina N-terminal)	Deficiencia en niños	Protropin (Genentech)	<i>E. coli</i>	1985
Hormona de crecimiento humana (hGH)	Deficiencia en niños	Nutropin (Genentech)	<i>E. coli</i>	1985
		BioTropin (Biotechnology General)	<i>E. coli</i>	1994
		Genotropin (Pharmacia & Upjohn)	Línea celular	
		Norditropin (Novo Nordisk)		
		Saizen (Serono Laboratories)		
		Serosim (Serono Laboratories)		
Glucagón	Hipoglucemia	Glucagen (Novo Nordisk)	<i>S. cerevisiae</i>	1998
Hormona estimulante del tiroides (TSH, tirotropina)	Detección/tratamiento del cáncer de tiroides	Thyrogen (Genzyme)	Células CHO	1998
Hormona foliculo-estimulante (FSH)	Anovulación superovulación Infertilidad	Gonal F (Ares-Serono)	Células CHO	1995
		Puregon N.V. (Organon)		
		Follistim (Organon)		
Entropoyetina (EPO)	Tratamiento de la anemia	Epogen (Amgen)	Células CHO	1989
		Procrit (Ortho Biotech)		
		Neorecormo (Boehringer-Mannheim)		
		Aranesp (Amgen)		
Derbopoyetina alfa	Tratamiento de la anemia inducida por quimioterapia	Dyrepe (Aventis S.A.)	Células CHO	2002
Entropoyetina delta	Anemia renal	Ovidrel (Serono Laboratories)	Línea celular humana	2002
Gonaabropina coriónica humana (hGC)	Tratamiento de la infertilidad	Forcaloini (Unigene UK Ltd.)	Células CHO	2000
Calcitonina	Osteoporosis, enfermedad de Paget, hipercalcemia	Forteo (Eli Lilly)	<i>E. coli</i>	1999
Hormona paratiroidea (PTH, Teparatida)	Osteoporosis	Lutropin alpha (Ares Serono)	<i>E. coli</i>	2001
Hormona luteinizante (LH)	Maduración de folículos	Regenerex (Ortho-McNeil Pharmaceuticals, Janssen-Cilag)	Células CHO	2001
PDGF	Úlceras diabéticas neuropáticas de las extremidades inferiores		<i>S. cerevisiae</i>	1997

disulfuro intra- e inter-catenarios de ambas cadenas generaba una insulina activa idéntica a la humana. Para competir con esta insulina recombinante, la compañía Novo Nordick comercializó el mismo año una insulina humana obtenida a partir de la de cerdo mediante un proceso biocatalítico, si bien esta misma compañía decidió más tarde abandonar este sistema para producir insulina recombinante humana en levaduras. Posteriormente, se han desarrollado otras insulinas modificadas buscando una mayor eficacia terapéutica y así por ejemplo, algunas insulinas modificadas pueden actuar de forma más rápida y otras, por el contrario, lo hacen más lentamente. Las moléculas de insulina tienden a dimerizar y hexamerizar cuando se almacenan a las dosis terapéuticas lo que retrasa el efecto de la insulina porque retarda su absorción en el torrente circulatorio por vía subcutánea o intramuscular. La oligomerización de la insulina se debe a las interacciones que se producen entre los aminoácidos de las posiciones B23-B28 de la cadena  $\beta$  y, por lo tanto, la modificación de estos aminoácidos puede reducir la oligomerización y modificar así la actividad de la insulina. Las insulinas Humalog y Liprolog de Eli Lilly tienen la Pro28 y la Lys29 de la cadena (invertidas en su posición con lo que se consigue una insulina de acción más rápida. De forma parecida la insulina NovoRapid de Novo Nordisk tiene sustituida la Pro28 por ácido aspártico para conseguir el mismo efecto que las anteriores insulinas de Eli Lilly. Por el contrario, la insulina Lantus de Aventis tiene sustituido el Asp21 de la cadena ( por glicina y además tiene dos argininas adicionales en la posición C-terminal, con lo que se consigue una insulina de acción más lenta.

El segundo producto recombinante que entró en el mercado farmacéutico fue la hormona de crecimiento humana (hGH). Debido a un fallo de diseño la primera hGH fue sintetizada en 1985 por Genentech en *E. coli* con una metionina adicional en posición N-terminal, por lo que no era exactamente igual a la hormona natural, que comienza por una fenilalanina. Esto motivó que, con posterioridad, otras compañías farmacéuticas pudieran comercializar sin problemas de patentes la verdadera hGH que se producía en *E. coli* mediante un nuevo proceso que implicaba la secreción de la hormona al periplasma bacteriano y evitaba la presencia de la metionina N-terminal.

Otras hormonas y factores de crecimiento se producen actualmente tanto en microorganismos, como *E. coli* y *S. cerevisiae*, como en cultivos

de células de mamífero. De especial relevancia es el caso de la eritropoyetina (EPO), ya que es uno de los productos de mayor mercado gracias no a su uso farmacéutico para combatir anemias, sino por su empleo como dopante en el deporte de élite. En este caso, es importante señalar que la EPO recombinante ha de producirse en células de mamífero, ya que para ser activa tiene que estar adecuadamente glicosilada. En muchas ocasiones, la correcta glicosilación de una proteína es un proceso esencial para que pueda manifestar su actividad y por ello en estos casos se requiere seleccionar la célula recombinante más adecuada para la producción de la misma.

Algunas hormonas se obtienen aún a partir de fluidos humanos. Este es el caso de la hormona humana folículo-estimulante (FSH) que se obtiene a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas. La producción de la FSH recombinante tiene ciertas ventajas, ya que entre otras cosas evita la contaminación con la hormona luteinizante (LH), que también se encuentra en la orina.

Cada vez son más las hormonas que se producen por tecnologías recombinantes con una alta eficiencia y a un coste razonable, pero lo que tal vez es más importante proporcionando una gran seguridad de uso (Tabla 2)

#### **4.1.2. Anticuerpos**

En 1975, Köhler y Milstein establecieron el método para producir anticuerpos monoclonales en ratón. Sin embargo, la utilidad de estos anticuerpos en terapéutica humana era muy limitada por su elevada inmunogenicidad. Por eso, desde entonces, se han realizado muchos esfuerzos para reducir esta inmunogenicidad, o lo que es lo mismo para humanizar los anticuerpos parcial o totalmente (Chadd y Chamow, 2001). A mediados de la década de 1990 se desarrollaron ratones transgénicos capaces de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos. Esta tecnología permite obtener anticuerpos humanos utilizando las técnicas estándar de obtención de hibridomas. Gracias a estos avances tecnológicos los anticuerpos representan hoy en día una clase importante de fármacos para combatir enfermedades infecciosas, inflamatorias, cardiovasculares y cancerosas. Actualmente, el número de anticuerpos monoclonales en desarrollo es casi tan alto como el de las vacunas.

TABLA 3  
*Sistemas de expresión de anticuerpos*

<i>Sistema (fuente)</i>	<i>Tipo</i>	<i>Uso</i>
<b>Biorreactor</b>		
<i>Escherichia coli</i> (citosol, periplasma)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico
<i>Pichia pastoris</i> (medio de cultivo)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico
<i>Drosophila melanogaster</i> (medio de cultivo)	Mu scFv	Diagnóstico
Células de mamífero (CHO/NS0) (medio de cultivo)	Ch IgG1 Ch Fab Hz IgG1	Terapéutico
Híbrido (medio de cultivo)	Mu IgG2 Mu IgM Hu IgG2	Terapéutico
<b>Animal transgénico</b>		
Ratón (leche)	Ch IgG1	Investigación
Pollo (huevo)	No determinado	Terapéutico
Cabra (leche)	Ch IgG1 Hu IgG2	Terapéutico
<b>Planta transgénica</b>		
Tabaco (hoja)	SIgA/G: Ch	Terapéutico
Maíz (semilla)	Hz IgG	Terapéutico
Soja (vainas, semilla, tallo, hoja)	Hz IgG	Terapéutico
Arroz (semilla)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico
Trigo (semilla)	Mu scFv	Diagnóstico, terapéutico

Ch, quimérico; Hu, humano; Hz, humanizado; Mu, murino; SIgA/G, IgA/G secretada.

Los anticuerpos se producen en organismos transgénicos y en biorreactores tanto con bacterias como con células de mamífero (Tablas 3 y 4). Los organismos transgénicos (ratón, cabra, pollo, plantas) y las células recombinantes de mamífero (CHO, NS0) son los más adecuados para producir anticuerpos completos. Las bacterias sólo permiten obtener de forma muy eficiente fragmentos de anticuerpos. Una alternativa para producir anticuerpos humanos completos es utilizar lo que se denomina presentación en bacteriófagos (*phage display*). El producto inicial es un fragmento Fv de cadena simple (scFv) en el que un pequeño polipéptido se utiliza para

TABLA 4  
*Anticuerpos comercializados*

<i>Proteína</i>	<i>Unidad Terapéutica</i>	<i>Nombre comercial (compañía)</i>	<i>Año</i>
Muromonab CD3 (Mab murino contra CD3 de linfocito T)	Rechazo agudo de trasplante de riñón	Orthoclone OKT3 (Ortho Biotech)	1986
Dactinzumab (Mab humanizado contra la cadena $\alpha$ del receptor de IL-2)	Prevención del rechazo agudo de trasplante de riñón	Zenapax (Hoffmann La-Roche)	1997
Basiliximab (Mab quimérico contra la cadena $\alpha$ del receptor de IL-2)	Profilaxis del rechazo agudo de trasplante alógeno de riñón	Simullect (Novartis)	1998
Abciximab (Fragmento Fab derivado de un Mab quimérico, contra el receptor de plaquetas GPII/III)	Prevención de coágulos	ReoPro (Centocor)	1994
Rituximab (Mab quimérico contra CD20 de linfocitos B)	Linfomas disímicos al de Hodgkin	Rituxan (Genentech/IDEC Pharmaceuticals)	1997
Infliximab (Mab quimérico contra TNF- $\alpha$ )	Tratamiento de la enfermedad de Crohn	Remicade (Centocor)	1998
Trastuzumab (Mab humanizado contra receptor 2 del EGF humano, HER2)	Tratamiento contra metástasis de cáncer de mama si el tumor s obreprresa HER2	Herceptin (Genentech)	1998
Palivizumab (Mab humanizado contra un epítipo de superficie del virus respiratorio)	Profilaxis de la enfermedad del tracto respiratorio bajo por virus sinticial en niños		
Satumomab Pentetide (Mab murino contra TAG-72, glicoproteína de tumores)	Detección de cáncer colorectal y ovárico	Syngis (MedImmune, Abbott)	1998
Igovomab (Fragmento de Mab murino (Fab2) contra antígeno tumoral CA 125)	Diagnóstico de adenocarcinoma ovárico	OncoSint CR/OV (Cyrogen)	1992
Acritumomab (Fragmento de Mab murino (Fab) contra el antígeno carcinoembrionario humano, CEA)	Detección de metástasis de cáncer colorectal	Indinacis 125 (CIS Bio)	1996
Imicronmab-Pentetate (Fragmento de Mab murino contra miosina cardíaca humana)	Detección por imagen de metástasis de cáncer colorectal	CEA-scan (Immunomedics)	1996
Capromab Penetate (Mab murino contra antígeno tumoral de superficie PSMA)	Detección por imagen de infarto de miocardio	MyoSint (Centocor)	1996
Fragmentos de Mab murino (Fab/Fab2, mezcla) contra HMW-MAA)	Detección de adenocarcinoma de próstata	ProstaSint (Cyrogen)	1996
Noelunomab (Fragmento de Mab murino (Fab) contra antígeno de carcinoma)	Diagnóstico de lesiones de melanoma cutáneo	Tecemar K1 (Sornit)	1996
Sulesomab (Fragmento de Mab murino (Fab) contra NCA 90, un antígeno de superficie no específico de granulocito)	Detección de cáncer de pulmón	Veluma (Boehringer Ingelheim/NeorX)	1996
Volumumab (Mab humano contra citoqueratina asociada a tumor)	Diagnóstico por imagen de infecciones		
Mab contra virus T-linfotróficos tipos I y II(Abbott HTLV-I/ HTLV-II)	Inflamaciones de huesos en pacientes con osteomielitis	LeukoScan (Immunomedics)	1997
	Detección de carcinoma de colon o recto	Humaspect (Organon Teknika)	1998
	Para inmunosensayo de linfocitos T y B humanos infectados crónicos		
Adalimumab	Atritis reumatoide	Abbott Laboratories	1997
Ibritumomab tiuxetan	Linfomas disímicos al de Hodgkin	HUMIRA (Cambridge Antibody Technologies y Abbott Laboratories)	2002
Atenozumab (mAb anti CD52)	Leucemia linfocítica	Zevalin (IDEC Pharmaceuticals Corp.)	2002
		Campath 1Ilex Oncology Inc., Millennium Pharmaceuticals Inc. y Berlex Laboratories Inc.	2001

unir las regiones variables de las cadenas ligera y pesada del anticuerpo, o un fragmento Fab a partir de los cuales se debe reconstruir un anticuerpo completo y producirlo mediante un sistema de expresión idóneo.

Los fragmentos tipo scFv se utilizan para radioinmunodetección o para radioterapia *in situ*, ya que tienen una buena penetración en los tumores, una reducida antigenicidad y son rápidamente eliminados por el organismo, con lo que se disminuye su toxicidad. Por el contrario, los anticuerpos más grandes tienen una vida media mayor. La desventaja de la producción de los anticuerpos en bacterias es que no se pueden glicosilar en la posición Asn297, lo que es muy importante para mostrar su función efectora. De todas formas, hay que tener en cuenta que la glicosilación que se produce en el anticuerpo sintetizado por las células de mamífero depende del tipo de célula y por ello se han modificado por Ingeniería Genética las células CHO para simular una glicosilación más parecida a la humana.

#### **4.1.3. Vacunas**

La primera vacuna recombinante que se aprobó para su uso farmacéutico fue la vacuna contra el virus de la hepatitis B. Hasta entonces la vacunación contra esta enfermedad se hacía con virus atenuados (Tabla 5). La vacuna recombinante se produce en levaduras recombinantes que portan un gen que codifica una proteína de la cubierta del virus. Algunas toxinas que se utilizan para vacunas también se obtienen actualmente mediante Ingeniería Genética. La categoría más importante de los productos biofarmacéuticos que están actualmente en desarrollo es el de las vacunas, con casi 100 productos diferentes. La mayoría se están desarrollando para tratar o prevenir el cáncer. El resto se están desarrollando contra el SIDA y diferentes infecciones, fundamentalmente del aparato respiratorio.

#### **4.1.4. Proteínas que intervienen en los procesos de coagulación**

Cuando en el organismo se produce una hemorragia, un factor crítico para detenerla es la activación de la cascada de coagulación sanguínea. Este sistema está compuesto por una docena de proteínas presentes



TABLA 5  
*Vacunas recombinantes*

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

en el plasma, que actúan como un sistema de amplificación, de tal manera que un pequeño estímulo inicial da lugar a la formación final del coágulo de fibrina. La falta o deficiencia de una de las proteínas de alguno de los pasos intermedios de esta cascada de amplificación impide la formación de este coágulo y, por lo tanto, conduce a un problema grave para el organismo. En el centro de esta cascada se encuentran los factores VII, VIII y IX, cuya carencia genera los tipos más frecuentes de problemas hemofílicos que conducen a hemorragias prolongadas. La deficiencia del factor VIII genera la hemofilia A o hemofilia clásica, que supone un 80% de los casos de hemofilia en el mundo, en tanto que la deficiencia del factor IX conduce al otro tipo más frecuente, la hemofilia B. La hemofilia se combate mediante el aporte del factor deficitario y por ello antes de su producción por técnicas recombinantes era necesario extraerlo de la sangre de donantes. Al tratarse de un hemoderivado el riesgo de que

los pacientes hemofílicos contrajeran enfermedades virales (hepatitis, sida y otros virus) al administrarles el producto era muy alto y de hecho se registraron bastantes casos de infecciones virales en los pacientes tratados con estos productos. Por consiguiente, era prioritario el desarrollo de los factores VIII y IX recombinantes, y el primero de estos se puso en el mercado en 1992 (Tabla 6). Su producción ha de hacerse en células de mamífero CHO o BHK, ya que la correcta glicosilación de la proteína es fundamental para su actividad.

El Factor VIIa recombinante se puede utilizar para revertir el exceso de anticoagulación producido por los anticoagulantes orales, por lo que puede emplearse en personas con riesgo de sangrado. Actualmente, los pacientes con sobredosificación de anticoagulantes son tratados con plasma para revertir rápidamente el efecto secundario de sangrado que conlleva el uso de estos medicamentos. Sin embargo, el plasma no sólo supone una sobrecarga de volumen, que muchos pacientes no pueden tolerar, sino que además, este tratamiento no está exento de riesgos de transmisión de infecciones. Por esto el uso de proteínas de origen recombinante es más seguro.

Si tan problemática es la ausencia de una coagulación correcta también el exceso de formación de coágulos puede conducir a la aparición de trombos, que a su paso por el cerebro o el corazón suelen ser mortales. Para destruir estos coágulos, el organismo utiliza el sistema fibrinolítico empleando la plasmina que procede del plasminógeno activado por las denominadas proteínas activadoras de plasminógeno (*i. e.*, tPA, activador tisular del plasminógeno y uroquinasa, uPA, o activador de plasminógeno urinario), que se encuentran en distintos fluidos del organismo. Dado que el tPA es más específico que la uPA, se considera al tPA de primera elección y es por ello que el primer anticoagulante recombinante que se comercializó fue el tPA. Actualmente, también se utiliza para este fin la estreptoquinasa, que es una proteína de *Streptomyces*, que si bien es mucho menos específica que el tPA y conlleva el riesgo añadido de provocar alergias, resulta mucho más barata.

La hirudina es una proteína que se encuentra en la saliva de la sanguijuela (*H. medicinalis*), que se une de forma selectiva a la trombina y que, por lo tanto, impide la hidrólisis del fibrinógeno, o lo que es lo mismo su acción anticoagulante. La hirudina recombinante se puede utilizar

TABLA 6  
Factores de coagulación de la sangre de origen recombinante

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

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

como anticoagulante. La  $\alpha$ 1-antitripsina y la antitrombina III son proteínas del plasma cuya deficiencia es relativamente frecuente en la población. La primera se sintetiza en el hígado y su deficiencia es responsable de enfisemas pulmonares. La segunda regula la formación del coágulo y por ello su deficiencia conduce a un aumento de la formación de coágulos y a perturbaciones del sistema inmunitario. Actualmente, estas proteínas están siendo objeto de desarrollo mediante tecnologías recombinantes.

La ingeniería de proteínas ha permitido sacar al mercado nuevas formas de proteínas coagulantes o anticoagulantes más eficaces. Así, se ha desarrollado un factor VIII que posee una delección de su dominio B. También se ha desarrollado un tPA más rápido que tiene tres de sus cinco dominios delecionados [el dominio N-terminal (*finger domain*), el dominio EGF, y el dominio Kringle 1].

#### 4.1.5. Inmunomoduladores

Los interferones (IFNs) son un grupo de proteínas que se producen y secretan por diferentes tipos de células. Los más importantes se agrupan en tres familias, los IFN $\alpha$  de origen leucocitario, los IFN $\beta$  derivados de fibroblastos, y los IFN $\gamma$  producidos por linfocitos T. Existen al menos trece tipos distintos de IFN $\alpha$ , cinco de IFN $\beta$  y un número no muy bien determinado de IFN $\gamma$ . Cuando se descubrieron las propiedades antitumorales y antivirales del IFN $\alpha$ , las primeras producciones industriales se realizaban a partir de una línea linfoblastoide humana (Namalwa) en la que se generaba una mezcla de IFNs. Al poco tiempo, se pudieron clonar los genes de distintos interferones que se sintetizaron en *E. coli* con mayores rendimientos (Tabla 7). El IFN $\alpha$  fue uno de los primeros productos recombinantes en entrar en el mercado junto con la insulina y la hGH humanas. En la actualidad también se produce una forma de interferón recombinante que podría clasificarse como un IFN sintético (Infergen), ya que se ha desarrollado creando un gen sintético que codifica en cada posición el aminoácido más frecuente encontrado al comparar los distintos subtipos de IFNs.

La interleukina 2 (IL2) es una glicoproteína producida por los linfocitos T en respuesta a agentes mitógenos y antígenos. La IL2 estimula las propiedades citotóxicas de los linfocitos T y las células NK (*natural ki-*

TABLA 7  
*Inmunomoduladores de origen recombinante*

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

ller) y actualmente se produce mediante tecnología recombinante para combatir el cáncer y como antiviral. Otra interleukina con gran futuro farmacéutico es la IL11.

La generación de granulocitos y macrófagos a partir de células hematopoyéticas inmaduras depende de los factores estimuladores de colonias (CSF). Distintas formas recombinantes de estos factores se encuentran ya en el mercado para combatir la neutropenia en diversas patologías.

#### 4.1.6. Otras proteínas

Son muchas las proteínas de interés terapéutico que se están produciendo por tecnologías recombinantes y que no son fáciles de clasificar entre los anteriores epígrafes (Tabla 8). Un caso típico es el TNF (factor de necrosis tumoral) que es una citotoxina producida de forma natural por macrófagos activados que es capaz de provocar la muerte de los tumores. Actualmente, se comercializa gracias a que se produce de forma recombinante en *E. coli* y se utiliza como anticancerígeno.

Por otro lado, para mejorar la recuperación de las fracturas de los huesos y combatir ciertas patologías de la médula espinal se comercializa desde hace poco tiempo la proteína BMP (*Bone morphogenetic protein*) que es una proteína que estimula la regeneración del tejido óseo.

Distintas enzimas producidas por Ingeniería Genética se utilizan para hidrolizar/eliminar productos tóxicos en el organismo (*e. g.*, DNasa, ureasa, asparaginasa, glucocerebrosidasa), o para sustituir alguna deficiencia (adenosina deaminasa). Algunas han sido modificadas genética o químicamente para aumentar su eficacia.

El caso de la albúmina humana es un tanto paradigmático ya que si bien desde hace tiempo se puede obtener por Ingeniería Genética, su comercialización no es muy competitiva frente a la extracción a partir de plasma humano donde es muy abundante. Además la albúmina se usa como expansor de plasma en grandes cantidades (g/l) con lo que por una parte su producción ya no disfruta del valor añadido de los productos recombinantes que se usan en la escala de micro o miligramos, y además tiene el problema de que requiere una mayor precisión en la purificación, porque al usarla en el

TABLA 8  
*Distintas proteínas de origen recombinante*

Proteína	Unidad Terapéutica	Nombre comercial (compañía)	Sistema de producción	Año
Dornase- $\alpha$ (DNasa)	Fibrosis quística	Pulmozyme (Genentech)	Células CHO	1993
$\beta$ -Glucocerebrosidasa (difere en R495H y tiene un oligosacárido modificado)	Tratamiento de la enfermedad de Gaucher	Cerezyme (Genzyme)	<i>E. coli</i> .	1994
TNF- $\alpha$	Antitumoral	Beromun (Boehringer Ingelheim)	<i>E. coli</i>	1999
Fusión TNFR- Fragmento IgG	Artritis reumatoide	Enbrel (Immunex Wyeth Europa)	Células CHO	1998
Uricasa	Ácido úrico en plasma	Rasburicase (Elielk Sanofi-Synthelabo)	<i>S. cerevisiae</i>	2002
Bone Graff/IT-CAGE (Proteína morfogenética de huesos humana [rhBMP-2])	Enfermedades espinales degenerativas.	Infuse (Wyeth and Medtronic Sofamor Danek)	Línea celular	2002
	Fracturas de huesos	Diboterin alfa (Genetics Institute Europe B.V.)		
PEG-Adenosina deaminasa bovina	Inmunodeficiencia (SCID)	Adagen (Enzon, Inc.)	<i>E. coli</i>	1990
Albumina humana	Hipovolemia, Hemodíalisis	Albutein (Alpha Therapeutic Corporation)	Plasma humano	1986
Albumina humana recombinante	Hipovolemia, Hemodíalisis	Albagen (New Century Pharmaceutical)	<i>S. cerevisiae</i>	Desarrollo
		Recombinum (Delta Biotechnology)		
PEG-L-asparaginasa	Leucemia linfoblástica	Oncaspar (Erizon, Inc., Rhone-Poulenc Rorer)	<i>E. coli</i>	1994
$\alpha$ -Galactosidasa A humana	Enfermedad de Fabry	Agalsidase alfa (TKT Europe-5S AB)	Células CHO	2001
		Fabrazyme, Agalsidase beta (Genzyme B.V.)		
Nesiritida (péptido natriurético B humano)	Fallo cardíaco	Natrecor (Scios Inc.)	Síntesis	2001
Fomivirsen (oligonucleótido antisentido)	Reinitis por CMV en casos de SIDA	Vitravene (ISIS pharmaceuticals)	Síntesis	1998

orden de gramos cualquier pequeña contaminación se hace más evidente y puede provocar alergias. Como ya se ha comentado para otras proteínas de la sangre el mayor valor que aporta la albúmina recombinante es que evita la posibilidad de contaminación por virus de la sangre.

## **4.2. Polinucleótidos**

El vitravene es, por el momento, el único oligonucleótido aprobado para uso clínico, Este oligonucleótido inhibe la replicación del citomegalovirus humano (hCMV) por un mecanismo antisentido. Esta formado por 21 nucleótidos cuya secuencia es complementaria a una región del ARNm derivado del hCMV que codifica varias proteínas responsables de la regulación de la expresión del virus y que es esencial para su replicación. Actualmente, se encuentran en desarrollo cerca de una decena de oligonucleótidos antisentido fundamentalmente desarrollados para combatir el cáncer.

## **5. LAS EMPRESAS Y EL MERCADO FARMACÉUTICO DE LA BIOTECNOLOGÍA**

Ya se ha comentado que en 1982 la compañía Eli Lilly puso en el mercado la insulina humana recombinante producida en *E. coli*. La insulina de cerdo tenía por entonces un mercado establecido y se pensó en la opción de sustituirla por la humana recombinante que poseía una secuencia idéntica a la humana nativa. Actualmente, el mercado de la insulina humana constituye un claro ejemplo de un mercado farmacéutico maduro con un precio de venta de 400 €/g de insulina, que combina el hecho de ser un producto que se necesita para tratar una enfermedad crónica en grandes cantidades junto con la propiedad de que se obtiene a un coste aceptable mediante un proceso muy eficaz y fácilmente escalable. Las insulinas que comercializa Ely Lilly con el nombre de Humulin o Humalog alcanzan actualmente unas ventas mundiales que rondan los 1000 M\$ y 600 M\$, respectivamente.

Para hacerse una idea de hasta dónde puede llegar el desarrollo de proteínas recombinantes de uso farmacéutico con un coste competitivo puede tomarse como ejemplo el caso de la hormona de crecimiento bo-



vino de uso veterinario y que produce Monsanto en *E. coli* a un precio de venta de 11,6 €/g, lo que supone un coste de producción de la hormona del orden de 5 €/g (Swartz 2001).

Cerca de un centenar de productos biofarmacéuticos se utilizan actualmente en clínica de los que se benefician alrededor de unos 60 millones de personas en el mundo dentro de un mercado global que supera los 20.000 M\$. Se calcula que otros 500 productos biofarmacéuticos están en periodo de pruebas clínicas, sobre todo para combatir las enfermedades que más mortalidad causan en el mundo como el cáncer, los problemas cardiovasculares, los problemas neurológicos, y las infecciones. Los productos que más se están desarrollando son las vacunas y los anticuerpos monoclonales contra el cáncer. De esos 500 nuevos productos una treintena son fármacos basados en ácidos nucleicos que se pretenden aplicar con distintos fines (terapia génica, vacunas, sistemas antisentido y ribozimas).

Es importante destacar que en tanto que los primeros productos aprobados eran proteínas de reemplazamiento o sustitución con secuencias idénticas a las proteínas nativas cada vez son más los productos que contiene proteínas modificadas mediante diferentes tipos de ingeniería de proteínas o como también se ha mencionado, mediante modificación química que en muchos casos aumentan o disminuyen su vida media o su actividad y de esta manera modifican a voluntad su eficacia terapéutica.

Resulta interesante que el medicamento recombinante más vendido actualmente en el mundo sea la eritropoyetina en sus distintas presentaciones, si bien como se ha comentado más arriba su principal uso dista mucho de ser estrictamente farmacéutico (Tabla 9). Le siguen a cierta distancia los interferones y las distintas presentaciones de insulina humana. También es importante el mercado de los anticuerpos.

De acuerdo con los datos de la consultora Ernst & Young's, en el 2001 existían unas 4.200 empresas de biotecnología en 25 países que daban trabajo a unos 188.000 empleados. De estas empresas 1.879 son europeas, destacando con más de 100 empresas Alemania (365), Inglaterra (309), Francia (239), Suecia (190), Suiza (113), y Finlandia (112). En España se contabilizaban según esta consultora 28 empresas biotecnológicas. En cualquier caso, sólo 622 de todas las empresas de biotecnología cotizan en bolsa y de ellas 342 son de Estados Unidos y 104 son Europeas.

TABLA 9  
*Los medicamentos biofarmacéuticos más vendidos*

Producto	Proteína	Empresa	Mercado mundial en 2002 en MS
Procrit/ Eprex	Eritropoyetina alfa	J&J/ Ortho Biotech	4283
Epogen	Eritropoyetina	Amgen	2300
Intron	(PEG-INF/ Ribavirin)	Schering-Plough	2700
Neupogen	G-CSF	Amgen	1400
Humulin	Insulina	Eli Lilly	1060 (2001)
Avonex	Interferon $\beta$ -1a	Biogen	972 (2001)
Rituxan (en EU Mabthera)	Rituximab (anticuerpo humanizado)	Genentech/ Roche	1163
Enbrel	Etanercept (proteína de fusión de un anticuerpo-Fc y el receptor p75-TNF)	ImmuneX/Amgen	802
Humalog	Insulina	Eli Lilly	628 (2001)
Betaseron/Betaferon	IFN $\beta$ -1b	Schering AG	830
Cerezyme/Ceredase	Glucocerebrosidasa	Genzyme	619
Synagis	mAb humanizado	Abbott/ Medimmune	516 (2001)
NeRecormon	Eritropoyetina beta	Roche	1192
ReoPro	GBIb/IIIa-anticuerpo	Eli Lilly/Centocor	431 (2001)
Gonal F	Hormona foliculo-estimulante alfa (FSH)	Ares Serono	450
Rebif	IFN $\beta$ -1b	Ares Serono	549
Herceptin	Trastuzumab (anticuerpo anti-HER-2 )	Genentech/ Roche	385
Humatrope	Somatotropina (HGH)	Eli Lilly	312 (2001)
Protropin/Nutropin	Somatotropina (HGH)	Genentech	297
Activase	tPA	Genentech	180
Remicade	Infliximab (anticuerpo quimérico)	Schering-Plough	337
Serostim	Somatotropina (HGH)	Ares Serono	95.1
Pulmozyme	ADNasa humana	Genentech	138
Leukine	GM-CSF	ImmuneX/Schering AG	108 (2001)
Saizen	Somatotropina (HGH)	Ares Serono	124
Proleukin	Interleukina 2	Chiron	114
Aranesp	Darbepoyetina alfa	Amgen	400
Engerix-B	Proteína de la envuelta del virus de la hepatitis B	SmithKline Beecham	540 (1999)
Kogenate	Factor VIII	Bayer	424

## 6. EL FUTURO

La era de la genómica junto con las herramientas bioinformáticas han proporcionado un nuevo escenario de actuación para el desarrollo del binomio formado por los nuevos fármacos y las nuevas dianas terapéuticas. Se estima que el Proyecto Genoma Humano puede generar más de 10.000 dianas terapéuticas nuevas. Junto con ésto, las tecnologías genómicas y proteómicas contribuirán a detectar los genes y proteínas que se expresan y producen de forma diferencial en los distintos tejidos afectados por alguna patología, proporcionando una base científica para atacar de forma precisa la enfermedad (Reiss, 2001). Una vez que las dianas terapéuticas hayan sido identificadas, técnicas como el cribado robotizado de fármacos de alto rendimiento, la química y la biología combinatorial, la ingeniería de proteínas, y el modelado molecular contribuirán a diseñar nuevos fármacos de una forma más rápida y racional (Hutchinson, 1998).

Si bien las células microbianas y animales han sido hasta la fecha los sistemas de producción más empleados, poco a poco las plantas y los animales transgénicos comienzan a considerarse como posibles biorreactores para producir sustancias farmacéuticas. Compañías como Genzyme Transgenics (Framingham, USA), PPL Therapeutics (Edimburgo, UK), o Pharming (Leiden, Holanda) están estudiando la eficacia de productos obtenidos de animales transgénicos en ensayos clínicos (*i. e.*,  $\alpha$ 1-antitripsina,  $\alpha$ -glucosidasa, y antitrombina III). Se estima que actualmente están en desarrollo unos 20 productos obtenidos en ovejas, cabras o terneros transgénicos. Más aún, la posibilidad de clonar animales para estos fines es una realidad y como ejemplo está el caso de la oveja clónica «Dolly» que produce Factor IX humano.

No se puede cerrar este capítulo sin mencionar que las plantas transgénicas tienen un gran futuro como biofactorías farmacéuticas. Dado que las plantas proporcionan sistemas masivos y muy baratos de producción se puede pensar en ellas para utilizarlas en el caso de que se necesiten grandes volúmenes de producción, como puede ser en el campo de los aminoácidos, o las vitaminas. Actualmente, se están desarrollando plantas transgénicas para producir vacunas orales, es decir vacunas que sean efectivas por vía digestiva. Estas vacunas tienen la ventaja de que podrían llegar más fácilmente a los habitan-

tes de las regiones más pobres del planeta donde una vacunación clásica que requiere para su administración de sistemas de conservación fiables y personal cualificado puede ser complicada. Estas vacunas orales también tienen interés en acuicultura para vacunar a los peces frente a distintas infecciones. De todas formas aún se ha de trabajar mucho en estas vacunas, pues la vía digestiva no las hace suficientemente eficaces.

Como conclusión final cabe decir que el futuro de la biotecnología farmacéutica es enorme y es evidente que, por el momento, sólo ha deparado pequeños anticipos de su potencialidad. Se puede ser muy optimista ante la gran mejora que ha de producirse en la calidad de vida durante los próximos años.

## BIBLIOGRAFÍA

- Allsop, A. E. (1998) New antibiotic discovery, novel screens, novel targets and impact of microbial genomics. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 530-534.
- Altenbuchner, J., Herzberg, M. S., Syldatk, C. (2001) Hydantoinases and related enzymes as biocatalysts for the synthesis of unnatural chiral amino acids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 559-563.
- Andersen, D. C., Krummen, L. (2002) Recombinant protein expression for therapeutic applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 117-123.
- Cereghino, G.P.L. Cereghino, J. L., Ilgen, C., *et al.* (2002) Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 329-332.
- Chadd, H. E., Chamow, S. M. (2001) Therapeutic antibody expression technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 188-194.
- Chartrain, M., Salmon, P. M., Robinson, D. K., *et al.* (2000) Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 209-214.
- Chu, L., Robinson, D. K. (2001) Industrial choices for protein production by large-scale cell culture. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 180-187.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., Boyer, H. W., *et al.* (1973) Construction of biologically functional plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240-3244.

- Cornelis, P. (2000) Expressing genes in different *Escherichia coli* compartments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11: 450-454.
- Demain, A. L. (2000) Microbial biotechnology. *TIBTECH* 18: 26-31.
- Dordick, J. S., Khmelnitsky, Y. L., Sergeeva, M. V. (1998). The evolution of biotransformation technologies. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 311-318.
- Hancock R. D., Roberto, V. (2002) Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends Biotechnol.* 20: 299-305.
- Hashimoto, S., Ozaki, A. (1999) Whole microbial cell processes for manufacturing amino acids, vitamins or ribonucleotides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 604-608.
- Hashimoto, S., Ozaki, A. (1999) Whole microbial cell processes for manufacturing amino acids, vitamins or ribonucleotides. *Curr. Opin. Biotechnol.* 10: 604-608.
- Huisman, G. W., Gray, D. (2002) Towards novel processes for the fine-chemical and pharmaceutical industries. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 352-358.
- Hutchinson, C. R. (1998) Combinatorial biosynthesis for new drug discovery. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 319-329.
- Kirk, O., Borchert, T. V., Fuglsang, C. C. (2002) Industrial enzyme applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 345-351.
- Martín, J. F., Demain A. L. (2002) Unraveling the methionine-cephalosporin puzzle in *Acremonium chrysogenum*. *Trends Biotechnol.* 20: 502-507.
- Nielsen, J. (1998) The role of metabolic engineering in the production of secondary metabolites. *Curr. Opin. Microbiol.* 1: 330-336.
- Ogawa, J., Shimizu, S. (1999) Microbial enzymes: new industrial applications from traditional screening methods. *TIBTECH* 17: 13-20.
- Peñalva, M. A., Rowlands, R. T., Turner, G. (1998) The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *TIBTECH* 16: 483-489.
- Perera, J., Tormo, A., García, J.L. (2002) *Ingeniería Genética*. Editorial Síntesis S.A. Madrid.
- Reiss, T. (2001) Drug discovery of the future: the implications of the human genome project. *Trends Biotechnol.* 19: 496-499.
- Rodríguez, E., McDaniel, R. (2001) Combinatorial biosynthesis of antimicrobials and other natural products. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 526-534.
- Schmid, A., Hollmann, F., Park, J. B., *et al.* (2002) The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 359-366.
- Stafford, D. E., Stephanopoulos, G. (2001) Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 336-340.

Straathof, A. J. J., Panke, S., Schmid, A. (2002) The production of fine chemicals by biotransformations. *Curr. Opin. Biotechnol.* 13: 548-556.

Swartz, J. R. (2001) Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. *Curr. Opin. Biotechnol.* 12: 195-201.

Walsh, G. (2000) Biopharmaceutical benchmarks. *Nature Biotechnol.* 18: 831-833.

**Páginas web de interés**

<http://www.fda.gov>

[http://www.eudra.org/en\\_home.htm](http://www.eudra.org/en_home.htm)

<http://www.phrma.org>

<http://www.fda.gov/cber/>